

**CONTRIBUTION A L'ETUDE,  
PAR IMMUNOFLUORESCENCE, DE L'EPITHELIOMA  
ATYPIQUE DU RAT T 8 DE GUERIN**

---

**THÈSE**

présentée et soutenue publiquement

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN MÉDECINE**

par

**Françoise BELLUT née HILL**

le 13 Décembre 1964, à PONT-A-MOUSSON (Meurthe-et-Moselle)

1964

|                          |                                           |           |
|--------------------------|-------------------------------------------|-----------|
| Examineurs de la Thèse : | MM. HERBEUVAL, <i>Professeur</i> , .....  | Président |
|                          | LEGAIT, <i>Professeur</i>                 | } Juges   |
|                          | RAUBER, <i>Professeur sans Chaire</i>     |           |
|                          | CUNY, <i>Maître de Conférences Agrégé</i> |           |





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555001\\_0009](https://archive.org/details/IA41555001_0009)



**CONTRIBUTION A L'ETUDE,  
PAR IMMUNOFLUORESCENCE, DE L'EPITHELIOMA  
ATYPIQUE DU RAT T 8 DE GUERIN**

---

**THÈSE**

présentée et soutenue publiquement

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN MÉDECINE**

par

**Françoise BELLUT née HILL**

le 13 Décembre 1964, à PONT-A-MOUSSON (Meurthe-et-Moselle)

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| Examineurs de la Thèse : MM. HERBEUVAL, <i>Professeur</i> , ..... | Président |
| LEGAIT, <i>Professeur</i>                                         | } Juges   |
| RAUBER, <i>Professeur sans Chaire</i>                             |           |
| CUNY, <i>Maître de Conférences Agrégé</i>                         |           |



UNIVERSITE DE NANCY  
FACULTE DE MEDECINE

DOYEN : M. A. BEAU  
ASSESSEUR : M. J. ROUSSEL

Doyens Honoraires

MM. LUCIEN, PARISOT et P. SIMONIN.

Professeurs Honoraires

MM. JACQUES, JEANDELIZE, SANTENOISE, CHAILLEY-BERT, HAMANT,  
BINET, ABEL, MUTEL, FRANCK, MELNOTTE, VERMELIN, GUILLEMIN,  
HOUPERT.

Professeurs

|                                             |               |
|---------------------------------------------|---------------|
| Anatomie .....                              | M. BEAU       |
| Anatomie pathologique .....                 | M. FLORENTIN  |
| Chimie biologique .....                     | M. WOLFF      |
| Bactériologie et parasitologie .....        | M. HELLUY     |
| Clinique Chirurgicale A .....               | M. CHALNOT    |
| Clinique Chirurgicale B .....               | M. BODART     |
| Clinique Dermato-syphiligraphique .....     | M. BEUREY     |
| Clinique Gynécologique .....                | M. BERTRAND   |
| Clinique Médicale A .....                   | N.....        |
| Clinique Médicale B .....                   | M. KISSEL     |
| Clinique de Neurologie et psychiatrie ..... | M. ARNOULD G. |
| Clinique de Pédiatrie et puériculture ..... | M. NEIMANN    |
| Clinique Obstétricale .....                 | M. HARTEMANN  |
| Clinique Ophtalmologique .....              | M. THOMAS     |
| Clinique Oto-rhino-laryngologique .....     | M. GRIMAUD    |
| Clinique Rhumatologique .....               | M. LOUYOT     |

|                                                  |               |
|--------------------------------------------------|---------------|
| Clinique Stomatologique .....                    | M. GOSSEREZ   |
| Clinique de Pneumo-ptisiologie .....             | M. LAMY       |
| Clinique des Voies urinaires .....               | N....         |
| Clinique de Neuro-chirurgie .....                | M. LEPOIRE    |
| Electro-radiologie clinique .....                | M. ROUSSEL    |
| Embryologie .....                                | M. DOLLANDER  |
| Histologie .....                                 | M. LEGAIT     |
| Hydrologie thérapeutique et climatologique ..... | N....         |
| Hygiène et médecine sociale .....                | M. SENAULT    |
| Médecine légale .....                            | M. HEULLY     |
| Médecine du travail et réadaptation .....        | M. PIERQUIN   |
| Pathologie chirurgicale .....                    | M. LOCHARD    |
| Pathologie médicale .....                        | M. HERBEUVAL  |
| Physiologie .....                                | M. ARNOULD P. |
| Physio-pathologie respiratoire .....             | M. SADOUL     |
| Physique .....                                   | M. BURG       |
| Thérapeutique .....                              | M. FAIVRE     |
| Séméiologie chirurgicale .....                   | M. SOMMELET   |

#### Professeurs à titre personnel

MM. HARTEMANN Pierre, de LAVERGNE, HOUEL, BREHANT, DUREUX.

#### Professeurs sans chaire

MM. RAUBER, RICHON, CORDIER.

#### Agrégés pérennisés

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| Médecine .....    | M. LARCAN |
| Obstétrique ..... | M. RIBON  |

#### Maîtres de conférences agrégés

|                    |            |
|--------------------|------------|
| Anatomie .....     | M. CAYOTTE |
| Carcinologie ..... | M. CHARDOT |
| Chimie .....       | M. PAYSANT |
| Chimie .....       | M. NABET   |
| Hématologie .....  | M. STREIFF |

|                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| Histologie .....                | M. GRIGNON  |
| Hygiène .....                   | M. DEBRY    |
| Hygiène .....                   | M. FOLIGUET |
| Pathologie expérimentale .....  | M. LACOSTE  |
| Pharmacologie .....             | M. LAMARCHE |
| Physique .....                  | M. MARTIN   |
| Physiologie .....               | M. BOULANGE |
| Physiologie .....               | M. BOUVEROT |
| Physiologie .....               | M. BOURA    |
| Bactériologie .....             | M. BURDIN   |
| Electroradiologie .....         | M. ANTOINE  |
| Pédiatrie et puériculture ..... | M. PIERSON  |
| Pédiatrie et puériculture ..... | M. MANCIAUX |
| Médecine .....                  | M. SCHMITT  |
| Neurologie et psychiatrie ..... | M. TRIDON   |
| Maladies infectieuses .....     | N....       |
| Médecine légale .....           | M. de REN   |
| Médecine et thérapeutique ..... | M. GRILLIAT |
| Médecine et thérapeutique ..... | M. BABEAU   |
| Médecine et thérapeutique ..... | M. CUNY     |

#### Agrégés en exercice

|                                              |                 |
|----------------------------------------------|-----------------|
| Chirurgie .....                              | M. BENICHOUX    |
| Chirurgie .....                              | M. MICHON J.    |
| Chirurgie .....                              | M. GROSDIDIER   |
| Chirurgie .....                              | M. PREVOT       |
| Chirurgie .....                              | M. VICHARD      |
| Chirurgie .....                              | M. FRISCH       |
| Médecine .....                               | M. GILGENKRANTZ |
| Médecine .....                               | M. HURIET       |
| Médecine .....                               | M. GAUCHER      |
| Médecine légale et médecine du travail ..... | M. PERNOT       |
| Neurologie et psychiatrie .....              | M. LAXENAIRE    |
| Ophthalmologie .....                         | M. ALGAN        |
| Oto-rhino-laryngologie .....                 | M. WAYOFF       |
| Urologie .....                               | M. GUILLEMIN    |

#### Chargés de cours

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| Cardiologie .....                        | M. FAIVRE |
| Chirurgie et orthopédie infantiles ..... | M. BEAU   |

|                              |              |
|------------------------------|--------------|
| Gériatrie .....              | M. HERBEUVAL |
| Maladies mentales .....      | M. HACQUARD  |
| Médecine expérimentale ..... | M. SADOUL    |

### Agrégés libres

MM. ANDRE, ARNULF.

-----

Secrétaire : M. SEUROT.

-----

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver, ni les imputer.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR HERBEUVAL  
Professeur de Pathologie Médicale

Il nous a permis de nous initier à la Recherche et de travailler en équipe dans son Laboratoire de Pathologie Médicale.

Nous avons pu apprécier, au cours de nos études, la clarté de son enseignement magistral. Nous avons découvert, dans son Laboratoire, l'originalité et la portée de son esprit scientifique.

Nous le remercions de nous avoir confié un sujet aussi passionnant, et de nous avoir fait l'honneur de présider cette thèse.

## A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR LEGAIT  
Professeur d'Histologie,

qui nous a honoré en voulant bien accepter de juger ce travail.

Nous avons toujours admiré sa grande précision. Les conseils qu'il a pu nous donner ont été pour nous d'une grande utilité.

Qu'il trouve, dans ce travail, le témoignage de notre gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR RAUBER  
Professeur sans chaire d'Anatomie Pathologique,

dont nous avons pu apprécier, à la Faculté, comme à l'Hôpital, l'esprit critique et les connaissances étendues.

Qu'il soit remercié de l'honneur qu'il nous fait en comptant au nombre de nos juges.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE CUNY  
Maître de Conférences Agrégé de Médecine et Thérapeutique

La clarté de son enseignement nous a rendu de grands services dans la poursuite de nos études.

Qu'il trouve ici l'expression de l'admiration que nous lui portons.

## A MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN LOUYOT

Il nous a conseillé tout au long de nos études.  
Il a toujours fait preuve à notre égard de beaucoup d'indulgence et de sympathie.

Qu'il veuille bien accepter des remerciements  
pour l'amitié bienveillante qu'il a bien voulu nous témoigner.

## A MONSIEUR LE DOCTEUR DUHEILLE

Il nous a guidé constamment dans la réalisation  
technique et dans la rédaction de ce travail.

Qu'il soit vivement remercié de ses conseils et  
de sa gentillesse à notre égard.

A NOS MAITRES D'EXTERNAT '

Monsieur le Professeur Agrégé GRILLIAT

Monsieur le Professeur GOSSEREZ

Monsieur le Professeur Agrégé GERBAUT

Monsieur le Professeur Agrégé DE REN

Monsieur le Professeur FAIVRE

Monsieur le Professeur BERTRAND

Monsieur le Professeur KISSEL

Monsieur le Professeur G. ARNOULD

Monsieur le Professeur DUREUX

A qui nous devons notre formation clinique.

Nous sommes très heureuse de pouvoir remercier ici

**LA LIGUE NATIONALE CONTRE LE CANCER**

qui nous a accordé une bourse de recherche

et nous a ainsi permis de consacrer toutes nos activités

à la poursuite de notre travail.

A MES PARENTS

A MON MARI

A MES ENFANTS

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

- S E R M E N T -

-----

SUR MA CONSCIENCE, EN PRESENCE DE MES MAITRES ET DE MES  
CONDISCIPLES, JE JURE D'EXERCER LA MEDECINE SUIVANT LES LOIS  
DE LA MORALE ET DE L'HONNEUR, ET DE PRATIQUER SCRUPULEUSE-  
MENT TOUS MES DEVOIRS ENVERS LES MALADES, MES CONFRERES ET  
LA SOCIETE.

-----

Ce travail, réalisé en équipe dans le laboratoire de recherche médicale, dirigé par Monsieur le Professeur HERBEUVAL, a bénéficié de l'aide de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale et de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

## INTRODUCTION

Les techniques de concentration leucocytaire, mises au point pour la recherche des cellules tumorales dans le sang circulant (55, 58), ont fait apparaître l'hématologie sous un aspect nouveau et déconcertant. De nombreux problèmes de diagnostic cytologique se sont posés :

Les cellules tumorales qui passent dans le sang acquièrent des caractères nouveaux dûs au milieu. Elles peuvent être altérées (52 bis, 100 bis) vacuolisées, englobées dans des microcaillots. De plus, elles sont habituellement peu nombreuses et difficiles à identifier.

Ceci est d'autant plus vrai que l'emploi des techniques de concentration leucocytaire fait découvrir toute une population de cellules nouvelles et inattendues dans le sang de sujets normaux et cancéreux ; il s'agit de cellules endothéliales, mégacaryocytaires, plasmocytaires, histocytaires, d'amas érythroblastiques, mégacaryoblastiques... (51, 53, 54, 56).

Chacun de ces éléments peut être une cause d'erreur et de confusion avec les cellules tumorales.

Celles-ci, d'ailleurs, peuvent passer dans le sang, soit en amas, ce qui simplifie leur identification, soit isolément, ce qui entraîne de grosses difficultés diagnostiques.

Du fait de ces difficultés, l'utilisation des colorations habituelles en cytologie de desquamation (Papanicolaou - Shorr) est le plus souvent défailante en cytohématologie, car elle apporte rarement des arguments pour un diagnostic différentiel.

Il existe en effet, au cours du cancer, une migration cellulaire dite "d'accompagnement" (56 bis) qui trouve son origine d'une part dans les organes touchés (cellules régionales : hépatiques, gastriques, éléments trophoblastiques, cellules pulmonaires macrophagiques).

Il est impensable de ne pas utiliser des colorations hématologiques telles que celle de GIEMSA, puisqu'on se trouve précisément dans le sang. Mais, en plus, des techniques, basées sur l'histochimie, (PAS, peroxydase) apportent des arguments nouveaux et importants dans le diagnostic cytologique.

Nous avons voulu rechercher si, à cet ensemble de colorations, nous pouvions ajouter des informations de nature différente, tirées des propriétés immunologiques des cellules.

Nous devons à COONS (18, 19) une technique de fluorescence spécifique du plus haut intérêt. Le marquage par un fluorochrome de molécules d'anticorps, rend visible leur fixation sur les antigènes correspondants. L'immunofluorescence bénéficie de la finesse et de la spécificité des techniques immuno-chimiques, ce qui lui confère une grande valeur en cytologie.

Dans la mesure où, en effet, certaines lignées cellulaires possèdent des antigènes caractéristiques, absents des autres tissus de l'organisme, il est possible d'obtenir des immunosérums fluorescents se fixant électivement sur les cellules de ces lignées, et sur celles-ci seulement. On dispose alors de réactifs étroitement spécifiques, susceptibles de faciliter l'identification de cellules litigieuses.

Cette méthode a déjà été appliquée au marquage de cellules normales, (33, 34, 35, 37). Nous avons recherché dans quelle mesure il pouvait s'appliquer au diagnostic des cellules tumorales.

Nous possédons une tumeur expérimentale entretenue sur des rats de notre animalerie, et nous avons été amenés à étudier les propriétés immunologiques des cellules néoplasiques à notre disposition. Nous avons voulu vérifier s'il était possible de les colorer de façon spécifique, grâce à une réaction antigénique entre un antiserum préparé chez le lapin à partir des constituants de la cellule tumorale et les antigènes éventuellement présents dans la tumeur.

Les problèmes soulevés par les essais de marquage immunologique, dans le cas où il ne s'agit pas de cancer viral, sont très complexes, et les résultats obtenus encore contradictoires.

Les tumeurs expérimentales renferment des éléments antigéniques qui ne leur sont pas spécifiques. Il s'agit de la fibrine, (21) dont même les perfusions prolongées ne parviennent pas à débarrasser entièrement les tumeurs, et des antigènes de nécrose susceptibles de fixer certaines protéines plasmatiques de nature macroglobulinique, sans qu'un phénomène immunologique soit en cause.

Une deuxième catégorie de difficultés est due à la régression antigénique observée dans certaines tumeurs, tant par les méthodes immunologiques que par les techniques sérologiques. Cependant, si des injections préventives de tissus cancéreux modifiés ont parfois entraîné une immunité, il est souvent apparu, au contraire, une activation de la croissance de la tumeur greffée ultérieu-

rement : c'est le phénomène de la " facilitation immunologique " (46, 116) qui semble traduire une différence immunologique entre la tumeur et les tissus de l'hôte.

Enfin, si on a depuis longtemps remarqué l'absence sur certaines cellules tumorales d'antigènes caractéristiques des organes normaux correspondants, dans d'autres cas, on a pu constater la présence d'un antigène propre à la tumeur.

Il apparaît ainsi que si les cellules tumorales peuvent perdre des caractères antigéniques, elles peuvent également en acquérir de nouveaux. Chaque tumeur représente un cas particulier, et seul l'inventaire de ses caractères antigéniques renseignera sur la possibilité de la différencier immunologiquement du reste de l'organisme. Seule l'expérience pouvait nous orienter vers l'une ou l'autre de ces deux tendances.

L'intérêt de repérer une cellule par ces méthodes immunologiques est avant tout diagnostique. Il n'est pas interdit de penser que le fait de marquer une cellule puisse entraîner d'autres conséquences, essentiellement thérapeutiques. Non que nous envisagions une action cytotoxique de l'antisérum lui-même. Le succès, rare, de telles expériences ne concerne que des cas particuliers, et n'a jamais pu être généralisé. Nous songeons plutôt à utiliser comme véhicule l'anticorps, dont la conjugaison avec la fluorescéine aura précisé la localisation, en vue de concentrer un agent thérapeutique sur la tumeur.

Nous avons, dans ce travail effectué dans le Laboratoire de Pathologie Médicale, sous la direction de Monsieur le Professeur HERBEUVAL, entrepris l'étude des propriétés antigéniques de l'épithélioma T 8 de Guérin, tumeur transplantée non virale, par la méthode d'immunofluorescence.

Après avoir rappelé les bases immunologiques de notre travail, nous exposerons successivement les principes et la réalisation de notre expérimentation, les résultats auxquels nous sommes arrivés, puis nous discuterons l'interprétation pouvant être donnée à ces résultats. Le détail des techniques fera l'objet d'un appendice à la fin de ce travail.



## HISTORIQUE

L'immunologie des cancers est étudiée depuis le début du siècle. Après les sérums " curatifs " provoqués chez le pigeon, la chèvre, le mouton, à partir de cellules cancéreuses - ou de blastomycètes - (15, 60, 107, 125, 126), les premières transplantations qui ont suivi la publication de Moreau (85) en 1898 sur " l'inoculabilité de certains néoplasmes ", ont introduit l'expérimentation cancérologique chez l'animal, et en premier lieu l'étude de l'immunologie du cancer (26).

Les premiers auteurs furent enthousiastes et pensèrent être très près de guérir le cancer et de découvrir sa cause (10, 68). Bientôt, pourtant, on se limita à chercher soit une modification dans l'évolution des tumeurs après traitement de l'hôte ou du cancer lui-même, soit des réactions mettant en évidence antigènes et anticorps dans les sérums de cancéreux et d'animaux immunisés (113). Le mot " d'immunité ", lui-même, est mis en cause : BASHFORD lui préfère celui de " résistance ". (3)

Des études critiques, en particulier celle de WOGLOM en 1929 (127) accroissent encore la prudence en ce qui concerne l'interprétation des résultats et la conduite de l'expérimentation.

Les échecs répétés des expériences de prévention ou de guérison du cancer par les méthodes qui s'étaient révélées efficaces en ce qui concerne les maladies infectieuses, incitèrent les auteurs à se borner à mettre en évidence, et parfois à isoler, un antigène cancéreux ou un anticorps spécifique.

Depuis quelques années cependant, l'enrichissement des connaissances et des techniques en biologie cellulaire a redonné un nouvel essor à l'immunologie du cancer. Ces progrès se sont manifestés dans plusieurs domaines.

### I - ENRICHISSEMENT DES CONNAISSANCES ET DES TECHNIQUES EN BIOLOGIE CELLULAIRE

Il s'agit, en premier lieu, de la sérologie, où des découvertes très importantes ont été réalisées. Des méthodes analytiques permettent maintenant

de séparer les divers constituants d'un complexe antigénique : les méthodes d'ODIN (95) et d'OUCHTERLONY (94) utilisent les propriétés de diffusion des protéines dans la gélose ; l'immunoélectrophorèse, leur migration plus ou moins rapide suivant leur charge électrique. Dans les deux cas, des arcs de précipitation différencient les divers antigènes présents.

L'utilisation d'anticorps marqués par les isotopes radio-actifs (104, 112), ou par les dérivés fluorescents (selon la technique de COONS) permet de suivre la localisation cytologique et histologique des anticorps, *in vivo* et *in vitro*.

Enfin, certaines méthodes se signalent par leur grande sensibilité. C'est le cas de l'anaphylaxie passive, très étudiée par WATERMAN (117) et ZILBER (128), de la technique d'hémagglutination mise au point par BOYDEN (11). En présence des multiples antigènes cellulaires, ces méthodes ne donnent qu'une indication d'ensemble et ne sont pas discriminatives. Leur sensibilité expose à de nombreuses causes d'erreurs. Là, plus qu'ailleurs, des témoins rigoureux sont indispensables.

En second lieu, il s'agit des sciences physiques et biochimiques qui ont contribué à une meilleure connaissance de la cellule tumorale. Le microscope électronique a précisé la morphologie cellulaire et a permis de déceler la présence d'un virus dans certaines tumeurs. La centrifugation analytique des constituants cellulaires, réalisée d'abord par CLAUDE (16, 17), a entraîné l'étude immunologique comparée des divers éléments de la cellule. C'est ainsi que certaines particules ont pu être reconnues comme possédant le plus haut pouvoir antigénique : les microsomes et les mitochondries pour WEILER, les microsomes pour LUMSDEN.

Les connaissances acquises en biochimie sont aussi très nombreuses ; elles concernent en particulier le métabolisme cellulaire, les enzymes, et nous ne faisons que les citer.

Enfin, la génétique, avec la découverte des gènes d'histocompatibilité (45), a joué un grand rôle dans l'étude des réactions immunologiques entre la greffe et son hôte, et fait entrevoir l'importance des facteurs génétiques en immunologie tissulaire - et tumorale. Ces derniers ont conduit à généraliser l'utilisation de souches consanguines : l'honogénéité génétique étant nécessaire entre la tumeur et l'hôte, dans le cas de greffe tumorale, dans celui de l'immunisation à partir d'éléments tumoraux avant une transplantation, et surtout pour permettre une comparaison valable entre les tissus normaux et cancéreux.

Des progrès techniques ont ainsi été réalisés dans le domaine de la sérologie, de la connaissance de la cellule tumorale et de la génétique. De nombreux phénomènes ont pu être éclaircis, qu'il était jusqu'alors difficile d'inter-

prêter de façon cohérente. Mais les principes de recherche, les idées directrices de l'immunologie du cancer sont restés presque inchangés.

On cherche, d'une part, à réaliser un antisérum curatif, à créer une immunité chez des hôtes ou à étudier leur immunité naturelle vis-à-vis de greffes de tissu néoplastique. D'autre part, dans un but diagnostique, on recherche des méthodes permettant de déceler immunologiquement la présence de caractères tumoraux dans une cellule, un tissu, un organisme entier.

## II - LES TECHNIQUES DE RECHERCHES

Les recherches ont donné lieu à de très nombreux travaux qu'il serait fastidieux de vouloir détailler - mais dont nous essaierons de discerner l'orientation générale et de dégager les apports probants positifs ou négatifs concernant la présence ou non d'antigènes spécifiques dans les tissus tumoraux.

### a) Techniques non spécifiques.

Les arguments tirés des premiers essais de sérothérapie du cancer n'ont qu'une valeur très restreinte en raison des conditions expérimentales alors pratiquées.

Il n'en est pas de même d'autres techniques, qui ont pu être améliorées grâce aux connaissances nouvellement acquises. Elles étudient les réactions tissulaires de l'hôte : rejet de la greffe, modification de la croissance des tissus néoplasiques, et les réactions purement sérologiques de l'individu vacciné.

L'immunité apparue après la régression de la tumeur peut être due à la nature virale du néoplasme utilisé (3, 4, 5, 6, 27, 37, 40, 111), à l'opposition génétique existant entre l'hôte et la tumeur (49). Elle semble pourtant être spécifique de la tumeur dans certains cas où ces objections ont été prévenues : la tumeur étant provoquée chimiquement, les animaux utilisés étant consanguins. De toute façon, l'immunité est relative et sa durée très variable (1, 2, 41, 99, 100).

L'immunité provoquée par inoculation préventive de tissu tumoral modifié (12, 14, 37, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 84, 108, 111), ou d'immunsérum (92) appelle les mêmes réserves. Des immunisations effectives ont pu être constatées, mais les travaux n'ont pas toujours été très rigoureux. Quand il a été tenu compte de la consanguinité et de la nature de la tumeur (75, 106), l'opinion des auteurs était beaucoup plus nuancée.

L'antisérum, préparé par injections de tissu néoplasique atténué à des animaux d'espèce différente, mis en contact avec des cultures de cellules cancéreuses, peut présenter, in vitro comme in vivo, une activité cytotoxique (7, 8, 13, 77, 80, 81, 82). Celle-ci n'est pas spécifique : d'autres sérums, dirigés contre les tissus normaux, possèdent cette même propriété.

De nombreux travaux pourraient être cités ; ils ont sans doute contribué à améliorer les techniques, mais ne peuvent plus, pour la plupart, servir de référence. Un fait très important est cependant à noter : la préparation des animaux par des moyens divers, tendant à diminuer ou à supprimer leur réceptivité à des transplantations tumorales, a souvent entraîné au contraire, une augmentation de cette réceptivité (12, 30, 46, 47, 69, 110, 116). Ce phénomène est devenu évident dès les premiers travaux en immunologie cancéreuse, et il est difficile de lui donner une signification.

Les méthodes sérologiques ont été appliquées à la recherche d'iso-anticorps chez des animaux immunisés par inoculation de tissu cancéreux.

La réaction de précipitation entre un immunosérum antitumoral et les extraits cellulaires correspondants s'est révélée positive dans le cas de lymphosarcomes (92).

La technique d'hémagglutination, qui consiste à déposer un sérum immun sur des hématies tannées préalablement sensibilisées, est surtout utilisée dans la recherche des auto-anticorps (97).

La déviation du complément est la méthode la plus anciennement employée ; elle l'est encore aujourd'hui très fréquemment. Elle a été utilisée pour la recherche d'auto-anticorps. Dans ce cas, le sérum des cancéreux chauffé à 56° est mis en présence d'extraits de la tumeur correspondante. Il s'agit du cancer au sein (39, 109) ou de tumeurs diverses (44) chez l'homme, de différentes tumeurs chez l'animal : tumeur de FLEXNER-JOBLING du rat (42), de JENSEN du rat (43), de BROWN PEARCE du lapin (71, 72, 73, 74). La réaction, souvent positive, est plus forte lorsqu'il s'agit de sujets chez lesquels la tumeur a régressé.

La méthode de déviation du complément a servi, d'autre part, à mettre en évidence la présence, dans un immunosérum, de l'anticorps spécifique de la tumeur ayant servi à sa préparation. Des noyaux de cellules cancéreuses (115), des extraits salins de lyophilisat (72) ont été utilisés comme antigènes.

WEILER s'attache à l'étude des microsomes ou des mitochondries des cellules tumorales [tumeur du foie induite au jaune de beurre - en 1952 (120) -, tumeur rénale induite au stilboestrol - en 1956 (121)]-. C'est, en effet, dans ces particules qu'il retrouve les antigènes spécifiques des organes étudiés -

antigènes qui disparaissent dans les tissus cancéreux.

Ces conclusions s'opposent à la plupart des résultats publiés antérieurement. Elles rejoignent cependant une opinion très répandue. Suivant celle-ci, la multiplication plus rapide des cellules tumorales après plusieurs transplantations s'expliquerait par une dédifférenciation antigénique du tissu néoplasique, entraînant la perte des antigènes spécifiques, susceptibles de freiner sa croissance.

Dans ses premiers travaux, portant sur 6 tumeurs du foie, 4 hépatomes et 2 cholangiomes, WEILER compare les sérums anti-foie normal de rat et anti-tumeur hépatique (120). Il constate, dans le second, la disparition de l'anticorps anti-foie, (dont l'existence a été démontrée dans le premier sérum), et l'apparition d'autres anticorps. Ceux-ci ne sont pas spécifiques d'un antigène tumoral, mais l'antigène commun à d'autres organes du rat, à des titres moins élevés.

Il n'existe pas, en effet, d'antigènes spécifiques du foie dans l'hépatome : on parvient à éliminer tous les anticorps du sérum anti-tumeur par absorption sur des microsomes et des mitochondries de rate ou de rein, et le sérum anti foie ne réagit plus avec la tumeur quand il a été en contact avec des particules de rein ou de rate, alors qu'il réagit encore avec le foie. L'auteur reprend les mêmes travaux avec un cancer du rein induit au stilboestrol et aboutit aux mêmes conclusions.

NAIRN, utilisant, lui aussi, la méthode de déviation du complément (90), arrive à des conclusions semblables, bien qu'il ait préféré des méthodes plus sensibles au cours d'autres travaux (91).

Toutes ces techniques, qu'elles soient destinées à étudier les réactions tissulaires ou sérologiques de l'organisme, sont sensibles à un grand nombre de facteurs qu'elles ne permettent pas de dénombrer facilement. Elles ne pourraient être une démonstration irréfutable que si on parvenait à séparer les antigènes les uns des autres. Elles n'apportent qu'une indication générale.

#### b) Techniques analytiques.

Les techniques analytiques, diffusion en gélose et utilisation d'anticorps marqués, ont rendu des services beaucoup plus précis. Les auteurs qui les ont utilisées se sont entourés généralement de toutes les garanties connues : utilisation de races " Inbred ", de tumeurs non virales ; absorption sélective des sérums hétérologues.

La précipitation sur gélose, l'immunoélectrophorèse, permettent par le dénombrement des différents arcs de précipitation, d'analyser la constitution antigénique des extraits d'organes des tumeurs. Pourtant, elles ne peuvent mettre en évidence que des anticorps précipitants.

C'est ainsi que NAIRN (88), couplant trois méthodes lors de la recherche d'un anticorps spécifique de la muqueuse gastro-intestinale, ne trouve aucune ligne de précipitation en utilisant la double diffusion en gélose, alors qu'avec la méthode de fixation du complément et celle d'immunofluorescence, il parvient à découvrir la présence d'un antigène spécifique de la muqueuse.

Mais, dans la mesure où l'anticorps recherché est précipitant, il se peut que la méthode se révèle très sensible. Le même auteur (90) étudie l'hépatome du rat induit au diméthyl-aminoazobenzène, le carcinome rénal du hamster induit au stilboestrol et diverses tumeurs de la peau chez l'homme. Les antigènes qui servent à préparer les antisérums sont les microsomes pour le foie, les surnageants totaux (après élimination des noyaux) pour le rein et la peau.

Les trois méthodes précédentes sont utilisées. La méthode de fixation du complément ne donne pas de résultats satisfaisants. Les autres techniques permettent d'affirmer la disparition de l'antigène spécifique d'organe dans le cancer étudié. Par exemple, la ligne de précipitation qui existe entre les microsomes de foie normal et le sérum provoqué contre eux, disparaît si on remplace les microsomes normaux par des particules de cellules néoplasiques. Quand l'antisérum est rendu fluorescent, il ne marque que les microsomes normaux.

Dans leurs travaux plus récents (87), en 1962, NAIRN et ses collaborateurs n'utilisent plus que les deux méthodes qui leur semblent les plus valables. Ainsi, ils décèlent dans la muqueuse intestinale normale un antigène lié aux cellules mucoïdes, qui disparaît progressivement dans les lésions précancéreuses, puis dans les tumeurs malignes du tractus intestinal. Enfin, étudiant le sérum d'un malade, porteur d'un cancer rénal et immunisé avec des microsomes d'un cancer rénal identique, ils y découvrent une précipitine réagissant avec des microsomes de cancer rénaux. Celle-ci n'agit contre aucune autre tumeur.

L'immunoélectrophorèse complète les données obtenues par précipitation en gélose. Elle est encore peu utilisée dans la recherche en immunologie cancéreuse. Grâce à elle, DUFOUR (29, 31) et ses collaborateurs ont étudié les facteurs antigéniques de la cancérisation (128) et mis en évidence un antigène spécifique de la tumeur de WALKER, qui n'existe ni dans le foie de nouveau-né, de fœtus ou de gestante, ni dans le foie d'animaux atteints de diverses affections. Ils ont pu, par immunoélectrophorèse de solution protéique soluble (surnageant de centrifugation à 60 000 g pendant une heure) d'or-

ganes de rat porteur de cette même tumeur, observer le cycle de l'antigène tumoral spécifique (32).

### c) Techniques de marquage des anticorps. Immunofluorescence.

Le marquage des anticorps par les isotopes radio-actifs ou par des fluorochromes a été utilisé isolément (c'est le cas de presque tous les travaux de PRESSMAN), ou en association avec les méthodes déjà décrites (c'est le cas pour NAIRN et ses collaborateurs et pour WEILER).

PRESSMAN et ses collaborateurs, étudient les anticorps anti-tissulaires depuis plus de vingt ans, et ont mis au point la méthode de marquage des anticorps anti-tissulaires par l'iode radio-actif (9, 101). Ils l'ont appliquée à l'étude des tumeurs (22, 23, 24). Depuis peu, après avoir comparé les deux méthodes possibles pour repérer les anticorps (105), ils ont souvent utilisé le marquage à la fluorescéine. HIRAMOTO a ainsi démontré l'apparition d'un antigène nouveau dans l'hépatome du rat induit au N<sub>2</sub>-fluorenyl-acétamide (66).

Mais c'est WEILER qui, en 1955, semble avoir appliqué le premier la méthode de COONS au domaine de la cancérologie, (en parallèle avec la déviation du complément), en poursuivant ses travaux sur les hépatomes induits au diméthyl-aminoazobenzène et le cancer rénal du hamster induit au stilboestrol. Il vérifie par cette nouvelle méthode, ses travaux commencés quatre ans plus tôt.

Les antigènes spécifiques du foie et du rein décelés par la méthode de fixation du complément, sont localisés respectivement dans les cellules parenchymateuses du foie d'une part, et l'épithélium tubulaire du rein d'autre part (119, 122, 123). Les mêmes résultats sont obtenus en utilisant l'iode radio-actif et l'auto-histo-radiographie (118). Les cancers qui dérivent précisément de ces cellules, ne sont pas colorés par les anticorps fluorescents. Donc, il y a disparition de l'antigène spécifique.

Ces résultats furent alors violemment attaqués par HUGUES et ses collaborateurs (67, 79) qui prétendirent - en s'appuyant sur l'expérimentation - qu'il ne s'agissait pas du tout d'une réaction immunologique, mais d'une réaction de simple coloration, de nature physico-chimique. Ils obtenaient le même phénomène en utilisant les sérums marqués de lapin non immun, mis en présence de préparations de tissus tumoraux. La fluorescence ainsi obtenue, non retrouvée sur des préparations d'organes normaux étant, disaient-ils, retenue sur les cellules cancéreuses par des liaisons acidobasiques. Les auteurs proposaient même d'utiliser cette réaction, qu'ils disaient être spécifique, comme un moyen facile de diagnostic de lésions pré-cancéreuses.

NAIRN a repris alors les expériences de WEILER et de HUGUES (86-87). Ses conclusions rejoignent celles de WEILER et confirment la spécificité du marquage en immunofluorescence.

PRESSMAN et HIRAMOTO enfin, reprirent tous ces travaux dans leur ensemble. Ils provoquent un hépatome au N<sub>2</sub>-fluorenyl-acétamide, utilisent deux tumeurs transplantées du foie : l'hépatome de NOVIKOFF et le sarcome de SIMPSON (51), et montrent qu'elles ne réagissent pas avec l'immunsérum purifié anti-foie normal. Ils obtiennent les mêmes résultats avec un rhabdo-myosarcome (64) et plusieurs cas de mélanosarcomes (62).

La coloration obtenue en immunofluorescence, dans les travaux de WEILER, NAIRN, PRESSMAN semble bien due à des réactions antigéniques spécifiques. La préparation des antisérums rendus fluorescents, a bénéficié de nouveaux procédés techniques, tels que la chromatographie sur colonne de Sephadex, d'Amberlite, de DEAE cellulose, que ne connaissaient pas HUGUES et ses collaborateurs, ce qui peut expliquer leurs difficultés dans l'interprétation des images fluorescentes.

On est donc parvenu à clarifier ce que laissaient prévoir les méthodes globales, telles que la fixation du complément, essentiellement grâce aux possibilités d'analyse apportées par les méthodes de précipitation sur gélose et d'immunoélectrophorèse, et à celles de localisation des réactions par le marquage des anticorps. Les résultats ne vont pas tous dans le même sens, et ce fait doit être dû, en grande partie, à la difficulté d'obtenir une tumeur qui soit facile à étudier (ce qui exclut l'étude du cancer d'origine humaine) et qui, cependant, présente tous les caractères d'une tumeur spontanée.

## R A P P E L I M M U N O L O G I Q U E

L'étude immunologique des tumeurs présente de nombreuses difficultés du fait de la complexité antigénique des tissus, et en particulier des tissus néoplastiques. Il convient donc d'éliminer du cadre des recherches toutes tumeurs représentant un cas particulier (c'est le cas des tumeurs virales), et tout matériel susceptible de produire des réactions parasites.

Les interférences immunologiques sont inexistantes dans les tumeurs spontanées. Il convient donc de réaliser un ensemble hôte-tumeur qui s'approche le plus possible de la maladie cancéreuse spontanée, tout en présentant les avantages d'une tumeur transplantée : reproductible, facile à manier, de structure histologique connue. Cet ensemble doit être génétiquement homogène ; il nécessite, au départ, l'utilisation de race pure, d'animaux élevés en consanguinité.

Une tumeur, apparue spontanément ou provoquée chez un individu, devra être transplantée à des animaux possédant le même potentiel génétique. Sinon, la croissance de la greffe sera modifiée, si le transplant n'est pas tout simplement rejeté au même titre qu'une greffe de peau ou d'organe (45, 50). Des anticorps se formeront envers le tissu étranger, capables de masquer une éventuelle réponse de l'hôte vis-à-vis du cancer. L'immunité, la présence d'auto-anticorps ou l'apparition d'hétéro-anticorps chez un animal d'espèce différente, rien ne pourra, dans ce cas, être considéré comme spécifique de la cellule cancéreuse.

L'hétérogénéité des animaux d'expérimentation, de plus, ne permet pas de comparer les propriétés antigéniques des tissus normaux et cancéreux : il n'est pas alors possible d'obtenir des témoins valables.

Enfin, la tumeur peut acquérir des caractères génétiques nouveaux au contact de l'hôte (50). C'est ainsi que la tumeur T 8 de Guérin transplantée à des souris, modifie ses caractères antigéniques, sans qu'il y ait atteinte histologique.

DUX et ses collaborateurs (36) ont pu pratiquer des hétérogreffes de la tumeur de GUERIN sur la souris avec succès, et la greffer à nouveau à des rats. Cette nouvelle tumeur, qui a conservé toutes ses propriétés antigéniques antérieures, c'est enrichie, et provoque des anticorps supplémentaires chez le

lapin. Ceci est vrai, à un degré moindre, dans le cas d'individus de même race, non consanguins. Le but même de l'utilisation de cancer transplanté ne sera pas atteint, puisqu'il y aura eu variation génétique de la tumeur.

Il est donc nécessaire, dans tous les cas, de s'assurer de la consanguinité au sein d'un élevage. Une méthode simple est la greffe croisée de peau entre deux individus pris au hasard. S'il n'y a pas de rejet de la greffe, on peut considérer qu'il existe une homogénéité génétique des animaux. Il est indispensable de surveiller la persistance de cette homogénéité dans un élevage, même si les croisements sont toujours effectués entre animaux de la même portée.

En effet, il peut apparaître des mutations. Parfois visibles, portant sur la coloration des poils ou des yeux, elles sont le plus souvent inapparentes. Si l'on considère que la tumeur, de son côté, même toujours greffée à des animaux " inbred ", peut se transformer, on arrivera à une divergence, ayant tendance à s'accroître au fur et à mesure des transplantations.

Des conditions rigoureuses pour qu'une expérimentation soit valable sont donc nécessaires : homogénéité génétique de la tumeur et de l'hôte, surveillance de la consanguinité des animaux, examens bactériologiques fréquents des tumeurs.

La tumeur de Guérin, que nous avons utilisée dans notre expérimentation, est apparue spontanément chez un rat de même espèce que les animaux ayant par la suite reçu des transplants. Dans notre élevage, des rats " inbred " servent à l'expérimentation. Aucun virus n'a pu être mis en évidence de façon permanente dans les cellules néoplasiques (examens au microscope électronique par Madame HINGLAIS-GLIOT (61)). Il est cependant possible que la tumeur se soit modifiée génétiquement au cours des nombreuses transplantations subies, puisqu'elle est entretenue depuis 1934.

C'est pourquoi, les immunsérums, obtenus chez le lapin à partir d'éléments cellulaires, devront être débarrassés le plus possible des anticorps qui ne seraient pas vraiment spécifiques de la tumeur, mais de l'espèce, et des éléments non tumoraux dont on ne se serait pas débarrassé avec assez de soins lors de la préparation des antigènes (63, 21) : sérum, fibrinogène, conjonctif.

C'est pourquoi les absorptions de l'antisérum sont nécessaires : absorption sur du sérum, sur divers organes réduits en poudre. Il n'existe pas d'antigènes de FORSSMAN chez le rat, ce qui évite une absorption sur des hématies de moutons. Néanmoins, de nombreux témoins, organes de rat normal, sérum anti-organe normal de rat, sérum de lapin normal, sont indispensables.

Enfin, nous avons été frappés par l'aspect rapidement nécrotique pris par la tumeur et par ses métastases. Nous pouvions nous demander si les caractères antigéniques décelés par les immunsérums, ne correspondaient pas à des déterminants antigéniques démasqués par le processus de nécrose, mais non spécifiquement tumoraux. C'est pourquoi, nous avons inclus dans nos sérums témoins des préparations d'organes rendus nécrotiques, mais provenant d'animaux non tumoraux.

Nous avons ainsi essayé de prévoir toutes les interférences immunologiques possibles, et de les éliminer. Il reste cependant que la tumeur T 8 de Guérin du rat, est une tumeur transplantée depuis longtemps et que les résultats obtenus devront être vérifiés sur d'autres tumeurs plus proches du cancer spontané.



## PRINCIPE ET REALISATION DE L'EXPERIMENTATION

L'Epithélioma atypique T 8 de Guérin chez le rat, est dérivé d'une tumeur utérine spontanée. Elle est apparue en 1934 dans l'élevage de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif (48). Nous l'entretenez depuis 6 ans dans la souche de rats Wistar " Inbred ", maintenue au laboratoire.

### I - ENTRETIEN DE LA SOUCHE

Nous connaissons cette tumeur qui est d'un maniement facile, évolue rapidement suivant toujours les mêmes modalités cliniques, et produit une quantité de tissu tumoral assez abondante. Les transplantations sous-cutanées ne nécessitent qu'un légère anesthésie à l'éther, une courte incision de la peau dorsale, un décollement des plans cutanés et sous-cutanés, et le dépôt, entre ces plans, d'une petite masse de tissu tumoral de quelques millimètres carrés.

Cette greffe, ainsi pratiquée, est presque toujours suivie de succès. A l'origine, nous découpons d'assez volumineux transplants. Nous avons voulu réduire leur taille, et avons dû, pour obtenir les mêmes résultats, prélever des fragments tumoraux directement sur le rat anesthésié, non encore sacrifié.

Depuis que nous possédons la tumeur, quatre rats ou plus, sont greffés toutes les deux à quatre semaines. Le pourcentage de prise des transplants est environ de 95 %.

Trois à quatre jours après l'inoculation, une tuméfaction apparaît, qui grossit progressivement jusqu'à atteindre, au dixième jour, le volume d'une grosse noisette. A ce moment, l'état général ne semble pas atteint. L'autopsie ne montre pas habituellement de métastases. Une anémie commence pourtant à se développer, puisque le nombre des globules rouges chute déjà de 7 000 000 à 4 500 000 au mm<sup>3</sup>.

Dès le quinzième jour, jusqu'à la mort qui survient en général entre le trentième et le quarantième jour, le rat se cachectise, des métastases apparaissent dans tous les ganglions, qui deviennent aussi volumineux que la tumeur

primitive, et parfois dans le poumon et les surrénales. On en découvre aussi dans le foie et le pancréas à l'examen histologique. A ce moment, la tumeur a la taille d'une grosse noix, à contours irréguliers. Son centre est nécrotique, et il ne persiste à sa périphérie qu'une mince coque de tissu tumoral blanchâtre, d'aspect onctueux, entourée de tissu conjonctif.

La peau, infiltrée, est cartonneuse. Une surinfection existe souvent à ce stade terminal. La nécrose aseptique centrale de la tumeur se transforme en une masse purulente. Le matériel devient inutilisable. L'état général est très atteint, et la formule sanguine se modifie : à la lymphocytose normale du rat fait suite une polynucléose très nette. Le nombre des globules rouges s'abaisse jusqu'à 2 000 000 à 3 000 000 par mm<sup>3</sup>.

On doit préciser que, lors des premières transplantations (en 1934) l'évolution des tumeurs était différente. Le pourcentage de réussite n'était que de 10 %. Il s'accrut progressivement jusqu'au cinquième passage où il atteignit 90 %. Certaines tumeurs n'apparaissaient alors que trois ou quatre mois après la greffe. Actuellement, la durée de vie moyenne des rats cancéreux après la transplantation est environ de cinq semaines.

C'est vers le quinzième jour qu'il est indiqué d'utiliser la tumeur ; la masse cancéreuse, débarrassée du tissu conjonctif qui l'entoure et de la nécrose centrale, est d'environ cinq grammes.

La description des différentes techniques utilisées étant détaillée, en annexe, à la fin de ce travail, nous ne donnerons ici que les principes qui nous ont guidés dans le choix et la réalisation de ces techniques.

## II - PREPARATION DES HOMOGENATS DE TUMEUR

Anesthésié à l'éther, le rat est saigné par ponction cardiaque, puis perfusé à l'aide d'une solution de saccharose isotonique. Le tissu néoplastique est ainsi débarrassé au maximum du sérum et des éléments figurés du sang. Nous prélevons alors stérilement la tumeur du rat. La stérilité est nécessaire, afin de ne pas entraîner d'éléments étrangers au tissu. Le tissu cancéreux est débarrassé du conjonctif et des débris nécrotiques, puis recouvert d'une solution de saccharose 0,25 M. PALADE employait une solution à 0,88 M. Nous avons préféré une solution moins visqueuse, ce qui permet de réduire le temps de centrifugation.

Le tissu ainsi obtenu est coupé en menus fragments ; nous avons à ce moment apporté un grand soin à le débarrasser de toutes traces de nécrose et de conjonctif. Il est ensuite homogénéisé à l'aide de l'appareil de POTTER.

L'homogénéisation permet de rompre les membranes des cellules et de libérer leur contenu, les cellules pouvant ainsi être dissociées sans que les divers éléments cellulaires soient altérés.

La cellule forme, en effet, un ensemble très complexe, dont on a, depuis une vingtaine d'années, essayé de séparer les différents constituants, par centrifugation différentielle (16). A cette époque, CLAUDE isola de petits granules, appelés plus tard microsomes, qui se révélèrent contenir la plus grande partie des ribonucléoprotéines du cytoplasme, et être le lieu de synthèse des protéines (96). Leur rôle biologique est très important, en particulier dans la cellule jeune et dans la cellule tumorale en plein développement, où il y a synthèse exagérée de protéines.

On peut penser qu'il y a une perturbation dans cette élaboration, et donc que les microsomes sont modifiés. C'est pourquoi nous avons été amenés à isoler ces éléments pour en faire une étude antigénique, en nous réservant le soin d'étudier ultérieurement les autres constituants cellulaires.

### III - ISOLEMENT DES MICROSOMES . PREPARATION DES ANTIGENES

Notre choix a été guidé, aussi, par des raisons pratiques : la fraction microsomiale est celle qui peut être obtenue le plus facilement.

C'est pourtant le noyau de la cellule cancéreuse qui, histologiquement, est monstrueux. Et VENDRELY (114), dans les cellules de la tumeur de Guérin, a mis en évidence des perturbations du contenu en acide désoxyribonucléique de la cellule jeune.

Mais les noyaux, par la méthode de centrifugation différentielle, sont difficiles à isoler. C'est la première fraction cellulaire qui sédimente, à des vitesses de centrifugation peu élevées (3 000  $\text{t/mn}$ ). Dans le sédiment, à cette vitesse, on trouve du conjonctif, des débris cellulaires, des hématies, dont on ne peut plus facilement les séparer. L'ensemble des noyaux forme un matériel hétérogène, et les nucléoprotéines, elles-mêmes, sont difficiles à obtenir à l'état pur.

Les microsomes ont l'avantage de former une fraction plus homogène, isolée suivant des conditions bien déterminées. Des centrifugations successives éliminent les fractions cellulaires lourdes formant le culot : noyaux, mitochondries, cellules entières n'ayant pas été broyées au cours de l'homogénéisation préalable, matériel extracellulaire. Le surnageant est repris et centrifugé à nouveau, avec une force centrifuge située entre 20 000 et 100 000 g, qui sépare les microsomes des fractions cellulaires solubles.

Les contaminants étrangers ne peuvent être que de peu d'importance : il faudrait qu'ils possèdent la même taille et la même densité que les microsomes. Les constituants antigéniques solubles, présents dans la tumeur, mais d'origine non tumorale (protéines sériques) sont éliminés dans le surnageant.

Après sédimentation des ribosomes, une nouvelle étape d'ultra-centrifugation (120 mn à 105 000 g) permet de recueillir une fraction postmicrosomiale généralement peu abondante. Le surnageant de cette dernière centrifugation constitue la fraction soluble de l'homogénat, assimilée au suc cytoplasmique.

Les microsomes totaux peuvent être traités par le désoxycholate de sodium à la concentration finale de 0,4 % en saccharose 0,25 M. Ce traitement dissout la membrane microsomiale et libère les particules de ribonucléoprotéines. Une nouvelle centrifugation de 120 à 105 000 g les fractionne en un extrait désoxycholique soluble et un résidu protéique insoluble.

Nous nous sommes attachés, d'abord, à l'étude de la fraction microsomiale totale. Cette fraction, sédimentée, est reprise par du sérum physiologique et mélangée à un volume égal d'adjuvant de FREUND. Il s'agit d'un mélange de mycobactéries, d'une huile minérale et d'un émulsionnant, destiné à activer l'antigénicité du produit. Mise en ampoules stériles, la solution peut être conservée deux à trois semaines, mais il est préférable de préparer de nouveaux antigènes avant chaque immunisation. Toute cette opération assez longue, est conduite aux environs de quatre degrés, ce qui évite de trop importantes altérations. Cette température est obtenue grâce à une chambre froide et à l'ultra-centrifugeuse réfrigérée SPINCO.

#### IV - IMMUNISATION DES LAPINS . RECUEIL DES SERUMS . MARQUAGE

Des lapins ont alors été immunisés. Il convient de préparer plusieurs animaux, la production d'anticorps variant avec chaque individu. Comme les antigènes tissulaires, même activés, sont assez faibles, plusieurs injections sont nécessaires.

De nombreuses méthodes d'immunisation ont été décrites : injections intraveineuses renouvelables tous les deux jours, injections multiples (intra-péritonéales, sous-cutanées, intra-musculaires, intra-veineuses) (124). Il semble que l'essentiel soit la répétition des inoculations de petites quantités de produit antigénique : de trop grandes quantités entraînant rapidement des lésions rénales et une baisse de l'état général du lapin, (25).

Nous administrons un millilitre du mélange chaque semaine, pendant six semaines en variant les points d'injections. Huit jours après la dernière injection, le sérum de l'animal est prélevé et débarrassé par centrifugation des éléments cellulaires et de la fibrine.

La fraction globulinique, qui contient les anticorps, est séparée par précipitation au sulfate d'ammonium à demi-saturation, puis marquée par conjugaison avec le chlorure de rhodamine.

Nous avons préféré, dans le cas de la tumeur de Guérin, la rhodamine à la fluorescéine. Cette dernière donnant une fluorescence verte, qui ressemble à la fluorescence naturelle du tissu conjonctif, et surtout à celle de certains témoins utilisés : le rein par exemple. Le sérum ainsi préparé, peut être conservé longtemps au froid.

Un sérum du même lapin est prélevé avant l'immunisation, marqué dans les mêmes conditions, et conservé au froid pour servir de témoin.

## V - UTILISATION DE L'IMMUNSERUM

Immédiatement avant d'être utilisées, les solutions fluorescentes sont absorbées sur poudres acétoniques ou lyophilisats d'organes divers de rat. On élimine ainsi le colorant qui a pu se libérer après une conservation un peu longue, et les anticorps non spécifiques.

Une fraction, qui servira de témoin négatif, est mise en contact avec de la poudre de tumeur elle-même. Après trente minutes, une centrifugation élimine la poudre absorbante. Il est parfois nécessaire de pratiquer plusieurs absorptions consécutives. Ce temps d'absorption est extrêmement important.

Les sérums sont prêts pour être mis en contact avec les différents organes qui seront étudiés : la tumeur elle-même, et, servant de témoin, des préparations de foie, rein, rate, thymus, utérus ; d'autre part, des organes rendus nécrotiques : rate, rein, foie.

Nous avons utilisé des frottis et des empreintes de ces divers organes - ou des coupes de ces tissus congelés -. Ces dernières ont l'avantage de permettre une certaine conservation des pièces congelées : à des températures de moins trente à moins quarante degrés, et une localisation histologique des images fluorescentes.

Les préparations sont utilisées sans fixation, ou après passage rapide dans l'acétone. Non fixées, elles ont tendance à se décoller au cours des nombreux traitements qu'elles ont à subir. Nous avons comparé les effets des fixations dans l'acétone, l'alcool éthylique à 95 %, l'alcool méthylique. C'est l'acétone qui nous a semblé être le fixateur le moins brutal altérant le moins les antigènes tissulaires.

Les préparations sont ensuite réhydratées au sérum physiologique, recouvertes de sérum fluorescent et laissées trente minutes en chambre humide. Lavées à nouveau trois fois au sérum physiologique, de façon à éliminer tout le colorant libre sur la lame et montées dans ce même milieu. Il est important de luter la lamelle recouvrante, les coupes sont très fragiles et le moindre glissement de la lamelle sur la lame risque de les déchirer. L'examen peut alors être fait à la lumière fluorescente.

Une série de lames est traitée dans la même séance : tumeur recouverte de sérum de lapin antitumeur, de sérum normal de lapin, de sérum antitumeur absorbé sur lyophilisat de tumeur. Deux ou trois autres organes sont recouverts des mêmes sérums et serviront de témoin.

Quand nous utilisons des coupes, une coupe sur deux est conservée et colorée par les méthodes histologiques classiques, pour permettre une comparaison et une identification des images, certaines structures faciles à reconnaître : vaisseaux, nerfs, servant de repères.

De toute façon, nous examinons les préparations en contraste de phase, et c'est ainsi que nous pouvons identifier les cellules et les tissus fluorescents.

Nous avons voulu vérifier par une autre méthode : la méthode de double diffusion en gélose, les résultats obtenus en immunofluorescence. Nous avons employé non seulement les microsomes, mais aussi les fractions microsomiales des cellules tumorales. Pour obtenir ce fractionnement plus poussé, nous avons mis en oeuvre la technique de D'AMELIO et PERLMAN (20, 98).

L'immunsérum utilisé est le même que dans la méthode précédente. La technique est celle d'OUCHTERLONY. Les divers antigènes préparés sont mis en présence du sérum immun d'une part, et du sérum du même lapin prélevé avant immunisation, d'autre part.

## R E S U L T A T S

Lors de nos premiers travaux, nous avons utilisé des frottis d'organes. La première difficulté a été de déterminer la durée de la fixation. Simplement séchées à température ambiante ou à l'aide d'un courant d'air chaud, les cellules se décollent sous l'effet des manipulations longues et traumatisantes. Fixées au contraire trop longtemps, elles sont altérées, et aucune réaction spécifique ne peut être mise en évidence. Nous utilisons finalement l'acétone, dans laquelle nos lames sont immergées pendant trois minutes. Nous obtenons, à la fin de l'opération, des étalements lisibles en microscopie en contraste de phase. Mais il est difficile, après les nombreux lavages au sérum physiologique, de les colorer par une méthode histologique ou cytologique : elles sont trop altérées et se colorent mal. Il est donc nécessaire de faire d'autres étalements, en même temps que ceux qui serviront à l'étude en immunofluorescence, destinés à être colorés soit au GIEMSA, soit au bleu de toluidine selon la méthode de SABRAZES.

Avec les empreintes de tumeur, les résultats n'ont pas été satisfaisants : les cellules se décollent beaucoup plus facilement que lors des étalements. Nous avons rapidement abandonné cette méthode.

Les coupes, enfin, sont obtenues à l'aide d'un microtome à congélation adapté à un cryostat (SLEE). Celui-ci permet une manipulation aisée du microtome et un maintien des pièces à une température de l'ordre de  $-30^{\circ}\text{C}$ . Nous avons pu conserver les pièces au congélateur, à  $-30^{\circ}\text{C}$  sans aucune fixation, pendant un à deux mois. Mais il s'est révélé préférable de les garder moins longtemps, car à la longue, les tissus acquièrent une autofluorescence gênante, et leurs propriétés immunologiques s'altèrent.

Nous prélevons la pièce, la congelons immédiatement par immersion dans de l'azote liquide, et effectuons de préférence les coupes immédiatement au cryostat. Les tissus normaux, le foie, le rein, les muscles, et même la rate peuvent donner des aspects histologiques comparables à ceux que l'on obtient avec des tissus fixés. Le tissu tumoral, par contre, se dilacère facilement en raison de la présence constante de zones nécrotiques, même lorsque macroscopiquement, le tissu semble bien homogène.

Après fixation, dans les mêmes conditions que les frottis, les colorations de GIEMSA, de SABRAZES, de MASSON, peuvent être mises en oeuvre. Pour nous permettre de mieux interpréter les images en immunofluorescence, nous rappelons brièvement l'aspect histologique et cytologique de la tumeur T 8 de Guérin et de ses métastases.

## I - HISTOLOGIE DE LA TUMEUR

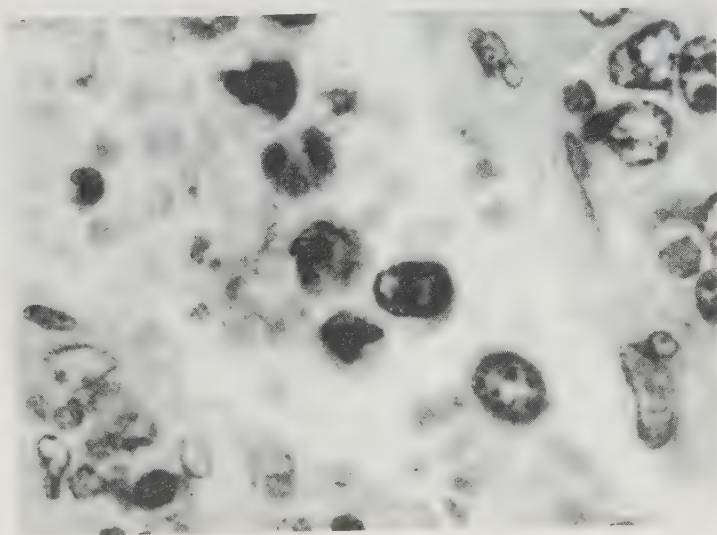
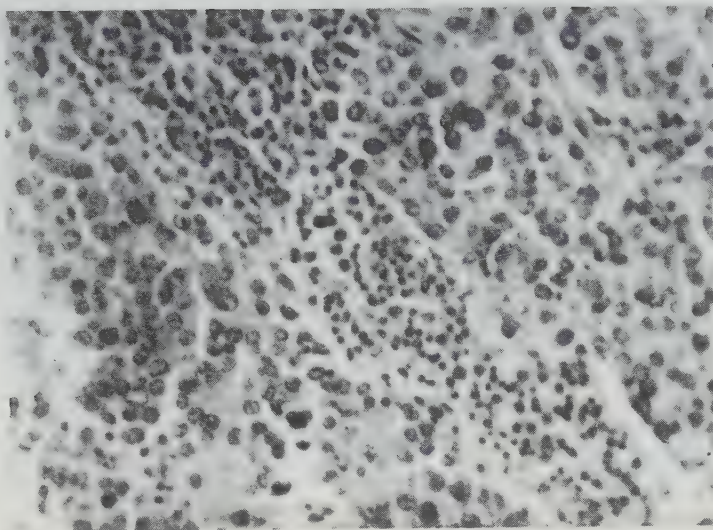
A l'examen histologique, la tumeur est bien encapsulée par une coque formée de quelques assises de fibres collagènes, dont partent de rares travées conjonctives, entre lesquelles prolifèrent des îlots très denses de cellules tumorales. De la périphérie au centre de la tumeur, le stroma s'estompe, les cellules entrent en pycnose pour ne plus former qu'une masse nécrotique centrale. Le stroma est réduit au minimum, la vascularisation est peu importante, ce qui paraît expliquer la rapidité et l'abondance de la nécrose tumorale.

Les cellules tumorales sont de grande taille ; elles se distinguent aisément par leurs monstruosité nucléaires : mitoses fréquentes, répartition irrégulière de la chromatine en blocs denses, qui donnent au noyau un aspect tigré, fréquence de la pycnose. Les nucléoles sont remarquables plus par leurs irrégularités et leur nombre que par leur taille. Le cytoplasme forme une marge périnucléaire étroite dans les cellules les plus jeunes, mais le rapport nucléoplasmique diminue au fur et à mesure de l'évolution des cellules vers la nécrose. La basophilie des cellules jeunes s'atténue parallèlement pour virer à l'acidophilie lorsque la nécrose s'installe.

Ces cellules paraissent très peu adhérer les unes aux autres ; elles se libèrent très facilement en prenant une forme arrondie. Il n'est pas rare de les retrouver à l'intérieur des veines péritumorales, qu'elles envahissent en formant des bourgeons d'où elles essaient.

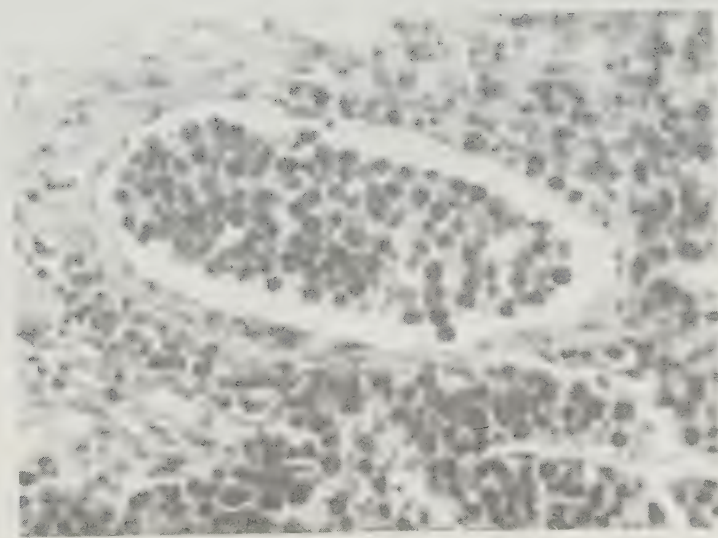
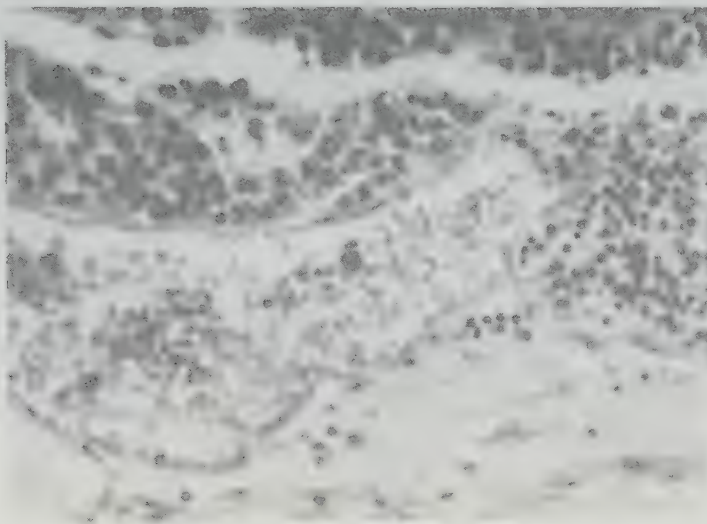
Les métastases, dont nous avons déjà appelé la multiplication, reproduisent exactement l'aspect de la tumeur mère, mais le réseau vasculaire de l'organe envahi reste en place et assure une meilleure nutrition des cellules cancéreuses, réduisant d'autant l'importance de la nécrose.

L'examen des frottis, en coloration de GIEMSA, permet de mieux détailler la cytologie. Les cellules tumorales forment la presque totalité de la population. On note la présence de cellules jeunes, de grande taille, assez souvent en mitose (quoique les mitoses se trouvent en plus grand nombre dans les métastases), à rapport cytoplasmique élevé, à grand noyau vésiculeux et irrégulier, à cytoplasme basophile clair. Des cellules matures à cytoplasmes intensément basophile, à noyau plus petit dont la chromatine tend à se rassembler



1. - Coupe de tumeur - coloration trichromique : hémalum, fuschine-ponceau de xylidine, bleu d'aniline - grossissement 250.
2. - Cellules néoplastiques - même coloration - grossissement 650.





3. - Quelques cellules néoplasiques dans la lumière d'une veine - grossissement 250.

4. - Embolie massive de cellules tumorales dans une veine - grossissement 250.  
Photographies réalisées par Madame H. HERBEUVAL - Préparations histologiques de Monsieur M. BELLUT.



en mottes : ce sont les plus nombreuses. A ce stade, elles ressemblent fortement à des érythroblastes. Puis les cellules se pycnosent, la chromatine se condense, le cytoplasme vire à l'acidophilie. Enfin, il y a nécrose totale de la cellule, avec homogénéisation du cytoplasme dont les structures disparaissent, et où l'on ne reconnaît plus que quelques amas de chromatine dispersés.

## II - IMMUNOFLUORESCENCE

Les sérums immuns proviennent de différents lapins préparés par des injections de microsomes. La formation d'anticorps varie considérablement suivant les individus. Nous avons choisi, pour la mise en oeuvre des réactions, le sérum du lapin présentant la meilleure spécificité. Nous étudierons successivement la localisation de ce sérum absorbé sur organes normaux (et en même temps sur plasma de rat, puisque les organes réduits en poudre, servant à l'absorption, n'ont pas été perfusés), le sérum immun non absorbé, puis celle du sérum non immun de même lapin prélevé avant l'immunisation.

Lorsque le sérum, rendu fluorescent, absorbé avec une poudre acétonique d'organes de rat (rein, foie, rate mélangés) ou une poudre de ces mêmes organes lyophilisés, est mis en présence de coupes de tumeur, on note les faits suivants :

La fluorescence la plus vive est observée dans les parties les plus nécrotiques de la coupe. Elle forme des plages très vivement éclairées, dont la brillance s'atténue en périphérie, là où les cellules sont mieux conservées. Au centre de ces plages, où toute structure a disparu, la répartition de la fluorescence est à peu près uniforme, tandis que, en périphérie, l'immunsérum paraît se fixer de préférence sur les cytoplasmes laissant les noyaux se détacher en négatif. Ce phénomène est encore plus net dans les zones de prolifération active, bien que la fluorescence y soit atténuée : seules les marges cytoplasmiques étroites des cellules tumorales jeunes sont marquées par l'immunsérum.

Dans les métastases, seules les coulées de cellules tumorales en voie de nécrose brillent très fortement. Les autres cellules cancéreuses ont une fluorescence plus atténuée. Le tissu sain ne présente qu'une fluorescence de fond, à peine visible.

Grâce à l'utilisation de la rhodamine comme marqueur, la fluorescence spécifique tranche nettement sur l'autofluorescence bleutée ou verdâtre de certaines structures tissulaires, telles que les fibres collagènes ou les limitantes élastiques des artères.

Sur les frottis, la répartition cytologique de la fluorescence est mieux

étudiée. Les cellules les plus jeunes n'ont qu'une activité réduite pour l'immunsérum. Seul leur cytoplasme se marque d'une fluorescence légère. La fluorescence devient nette avec les cellules plus âgées où le cytoplasme est fluorescent, alors que le noyau reste obscur. Quand les cellules entrent en pycnose, la fluorescence cytoplasmique s'intensifie, et une fluorescence nucléaire apparaît, marquant en premier lieu le suc nucléaire dans lequel baignent les mottes sombres de chromatine. Enfin, la fluorescence se répartit uniformément dans les cellules nécrotiques et la nécrose massive.

En présence d'organes de rats normaux : thymus, foie, rate, rein, une autofluorescence verte apparaît, d'origine essentiellement conjonctive. Seule une légère fluorescence de fond, non spécifique, est observée.

Par contre, l'immunsérum fluorescent, présente une certaine affinité pour les organes nécrotiques avec lesquels il est mis en contact : rein, rate, foie. Cette fluorescence est beaucoup moins intense que celle que l'on observe avec la nécrose tumorale.

Dans la tumeur elle-même, les cellules souches ne sont pas colorées, et la fluorescente qui apparaît dans le cytoplasme des cellules mûres s'accroît dans les cellules nécrobiotiques, en état de pycnose, pour atteindre une intensité très grande dans la nécrose. Le stroma de la tumeur présente aussi une certaine fluorescence, due en grande partie au plasma présent dans la préparation et aussi aux rares fibres conjonctives.

Les organes normaux sont légèrement colorés, alors que la nécrose de tissu normal l'est beaucoup plus. La coloration est homogène et faible. Les noyaux des cellules de la rate, du foie ou du thymus ne sont pas colorés.

Le sérum de lapin non immun, rendu fluorescent, ne donne qu'une fluorescence de fond légère, non spécifique, marquant aussi bien le tissu normal que le tissu tumoral.

Après absorption du sérum fluorescent antimicrosomes tumoraux par de la poudre acétonique ou lyophilisée de tumeur de rat, on note une atténuation très nette de la fluorescence du tissu tumoral, non une disparition complète. Ce fait a déjà été remarqué par la plupart des auteurs ayant tenté d'éliminer, par absorption du sérum sur antigènes correspondants, toute trace de fluorescence spécifique.

En résumé, l'immunsérum fluorescent préparé contre la fraction microsomiale de la tumeur T 8 de Guérin, renferme des anticorps qui sont susceptibles de se fixer préférentiellement sur les cytoplasmes des cellules tumorales, avec une intensité d'autant plus grande que ces cellules évoluent vers la nécrose.

# PROPRIETES EN IMMUNOFLOUORESCENCE DES SERUMS DE LAPIN ANTIMICROSOMES TUMORAUX

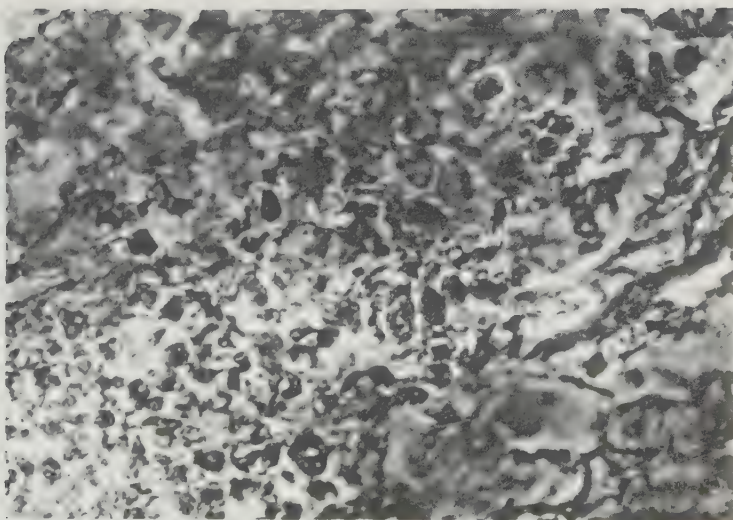
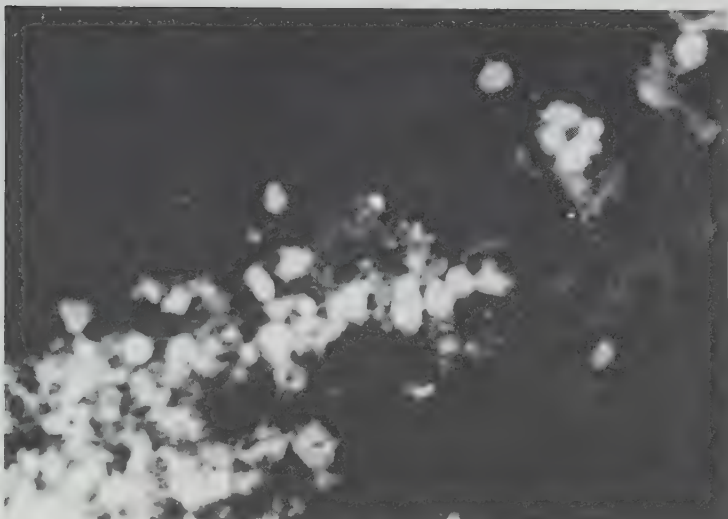
|                                        | immun-sérum<br>anti T 8<br>non absorbé | immun-sérum absorbé<br>sur organes normaux<br>sur plasma de rat normal |
|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 1) Tumeur                              |                                        |                                                                        |
| Cellules souches                       | -                                      | -                                                                      |
| Cellules mûres                         | +                                      | +                                                                      |
| Cellules nécrobioti-<br>ques (Pycnose) | ++                                     | ++                                                                     |
| nécrose                                | ++++                                   | +++                                                                    |
| 2) Stroma                              |                                        |                                                                        |
| Conjonctif                             | +                                      | -                                                                      |
| Plasma                                 | ++                                     | -                                                                      |
| -----                                  | -----                                  | -----                                                                  |
| Organes normaux                        |                                        |                                                                        |
| Foie                                   | +                                      | -                                                                      |
| Rate                                   | +                                      | -                                                                      |
| Thymus                                 | +                                      | -                                                                      |
| -----                                  | -----                                  | -----                                                                  |
| Nécrose                                | ++                                     | +                                                                      |

++++ fluorescence très intense

+++ à + fluorescence proportionnelle au nombre de croix

- fluorescence de fond non spécifique

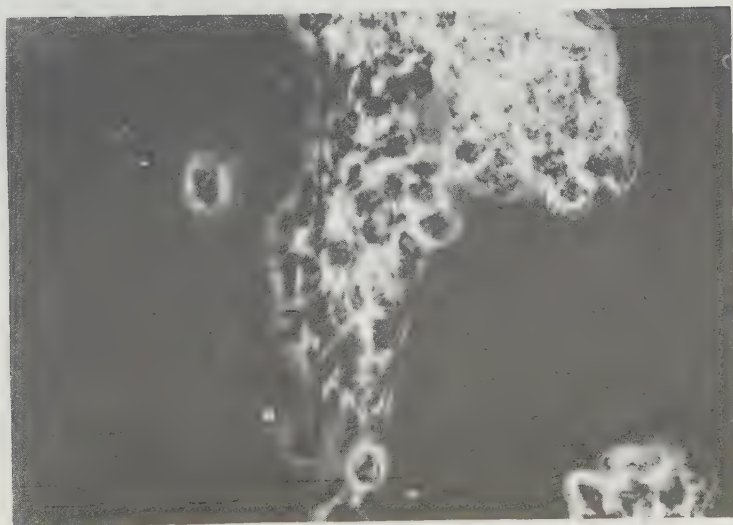
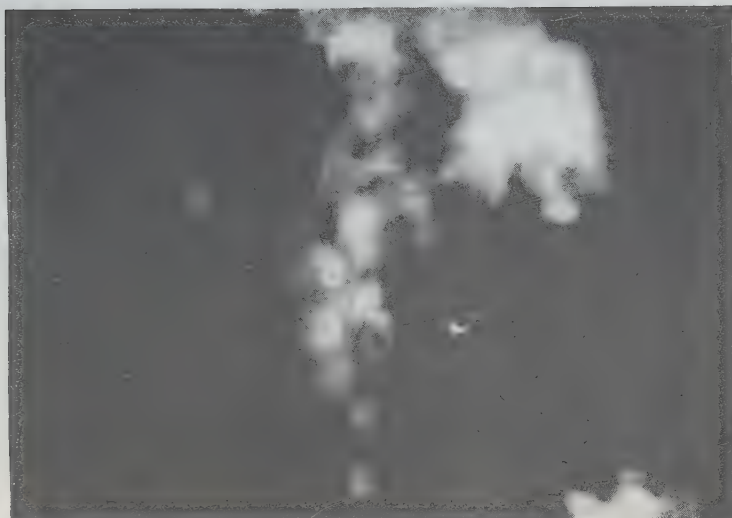




5. - Couées de cellules tumorales dans un ganglion. Coupe mise en présence de sérum anti-microsomes de tumeur T 8 de Guérin - Grossissement 400.

6. - Même champ - contraste de phase.





7. - Tumeur T 8 de Guérin mise en présence de sérum fluorescent anti-microsomes tumoraux - frottis - grossissement 400.

8. - Même champ - contraste de phase.

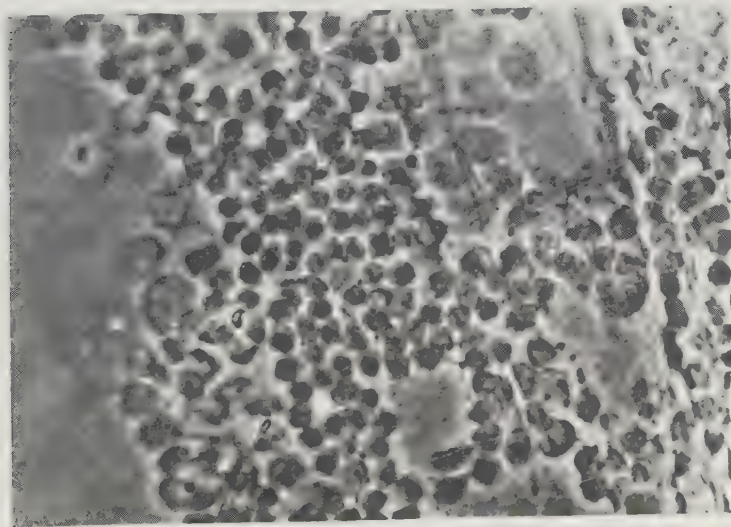




9. - Tumeur T 8 de Guérin mise en présence de sérum fluorescent anti-mitochondries tumorales - frottis - grossissement 900.

10. - Même champ - contraste de phase.





11. - Thymus de rat sain mis en présence de sérum fluorescent anti-microsomes tumoraux - frottis - grossissement 400.

12. - Même champ - contraste de phase.



Nous avons recherché s'il était possible de retrouver ces anticorps par la technique de double diffusion en gélose suivant OUCHTERLONY.

### III - DOUBLE DIFFUSION EN GELOSE

Le dispositif expérimental de cette méthode est décrit en annexe, seuls les résultats sont exposés ici.

Comme dans le cas de l'immunofluorescence, les réponses immunologiques varient d'un lapin à un autre. Le plus grand nombre de renseignements est obtenu par l'emploi des sérums donnant le plus grand nombre de lignes de précipitation. Nous n'avons pas observé de concordance avec l'immunofluorescence, en ce sens que les sérums marquant le mieux les tissus tumoraux ne donnaient qu'une médiocre réponse en double diffusion.

Avec le sérum ou le plasma de rat normal, les antisérums de lapin donnent un à trois traits de précipitation. Ces traits apparaissent en 48 heures et disparaissent après 72 heures. Vis-à-vis d'extraits d'organes normaux ou tumoraux, un trait discret apparaît et disparaît dans les mêmes conditions : on peut l'attribuer à un constituant d'origine sérique.

Ces réactions disparaissent après absorption des immunosérums par du sérum ou du plasma de rat. Les lignes de précipitation qui les traduisent sont coupées par celles, d'apparition plus tardive, données par des antigènes tissulaires proprement dit.

Un sérum de rat cancéreux a donné, outre les traits éphémères habituels, un trait d'apparition tardive persistant après absorption de l'antisérum antitumeur par du sérum de rat normal et se raccordant à l'un des traits de précipitation principaux des extraits tissulaires. Le rat était porteur d'une volumineuse tumeur très nécrotique, ayant essaimé en métastases multiples. Il n'est donc pas étonnant que des constituants d'origine tissulaire aient pu être retrouvés dans la circulation.

Tandis que les arcs correspondants aux antigènes sériques s'estompent, on voit apparaître de nouvelles lignes de précipitation vis-à-vis des extraits tumoraux.

Les microsomes totaux donnent alors cinq traits de précipitation, dont deux très épais, proches du réservoir d'antisérums, et trois plus discrets, proches du réservoir d'antigènes. Ces mêmes traits de précipitation se retrouvent dans l'extrait désoxycholique qui présente en plus un trait fin proche du réservoir d'antigènes.

Vis-à-vis de la fraction ribonucléique insoluble dans le désoxycholate, ne se développent que deux traits épais, se raccordant à ceux de mêmes caractères des autres fractions tumorales.

Le suc cytoplasmique ne présente également que ces deux traits.

Des organes non tumoraux ont servi de témoins. Les microsomes de foie normal donnent quatre traits de précipitation dont les deux plus intenses, proches du réservoir d'antisérums, se raccordent à ceux de mêmes caractères donnés par les autres fractions cellulaires normales ou tumorales. Les deux plus fins, proches du réservoir d'antigènes, ne se développent pas suffisamment pour qu'on en puisse étudier leur raccordement éventuel avec ceux d'autres fractions.

Nous noterons pour mémoire, le trait éphémère dû à un constituant sérique. Les mêmes traits se retrouvent avec l'extrait désoxycholique de microsomes et le suc cytoplasmique de foie, quoique avec des intensités différentes. Les ribonucléoprotéines ne donnent, par contre, que deux lignes principales.

La fraction microsomiale de rein normal ou nécrotique ne donne, outre un trait sérique éphémère, que trois traits dont les deux principaux se raccordent à ceux de même nature des autres fractions cellulaires. Le trait le plus fin est proche du réservoir d'antigènes.

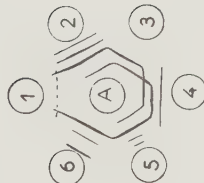
L'absorption des immunosérums antimicrosomes par du sérum ou du plasma de rat normal, fait disparaître les lignes d'apparition et de disparition précoce. Les arcs dûs aux antigènes cellulaires, bien qu'un peu moins nets, persistent.

Par contre, l'absorption des immunosérums par des microsomes totaux de foie ou de tumeur, entraîne la disparition de toutes réactions vis-à-vis des antigènes sériques ou cellulaires, normaux ou tumoraux.

Il n'est donc pas possible, par double diffusion en gélose, de mettre en évidence un caractère antigénique propre à la tumeur T 8 de Guérin. Ce fait, qui paraît être en contradiction avec les résultats obtenus en immunofluorescence, peut être dû à ce que, seuls, les antigènes diffusibles ayant provoqué la formation d'anticorps précipitants sont détectés par cette méthode. Or les microsomes qui nous ont servi à immuniser les lapins, représentent précisément une fraction insoluble et non diffusible du cytoplasme.

On peut donc penser que les anticorps révélés par la technique d'immunofluorescence sont dirigés contre des protéines insolubles, ou bien que la sensibilité de la technique d'immuno-diffusion est inadaptée et insuffisante pour les détecter.

BOITE A.



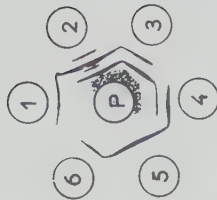
- A - Sérum de lapin antimicrosomes de tumeur T 8 de Guérin  
 1 - Sérum de rat normal  
 2 - Microsomes totaux de fœs de rat normal  
 3 - Extrait désoxycholique de microsomes de fœs de rat normal  
 4 - Microsomes totaux de rein de rat normal  
 5 - Suc cytoplasmique de fœs de rat normal  
 6 - Microsomes totaux de tumeur T 8 de Guérin

BOITE B.



- B - Sérum de lapin anti-microsomes de tumeur T 8 de Guérin  
 1 - Sérum de rat normal  
 2 - Microsomes totaux de fœs de rat normal  
 3 - Suc cytoplasmique de tumeur T 8 de Guérin  
 4 - Ribonucloproteïnes de tumeur T 8 de Guérin  
 5 - Extrait désoxycholique de microsomes de tumeur T 8 de Gué  
 6 - Microsomes totaux de tumeur T 8 de Guérin

BOITE P.



- P - Sérum de lapin anti-microsomes de tumeur T 8 de Guérin, absorbé par du sérum de rat normal  
 1 - Sérum de rat porteur de tumeur T 8 de Guérin  
 2 - Microsomes totaux de tumeur T 8 de Guérin  
 3 - Extrait désoxycholique de microsomes de tumeur T 8 de Guérin  
 4 - Ribonucloproteïnes de tumeur T 8 de Guérin  
 5 - Fraction Postmicrosomiale de tumeur T 8 de Guérin  
 6 - Suc cytoplasmique de tumeur T 8 de Guérin



## DISCUSSION

La méthode d'immunofluorescence permet d'objectiver une fixation du sérum de lapin antimicrosomes tumoraux sur du tissu néoplastique correspondant. Il est nécessaire de s'assurer qu'il s'agit bien d'une réaction immunologique spécifique de la tumeur, puis de tenter de déterminer la nature de l'antigènes qui l'a provoquée.

### I - NATURE IMMUNOLOGIQUE DE LA REACTION

Les difficultés, dues à la méthode utilisée, sont nombreuses (83, 89). Il est important d'éliminer la plus grande partie de la fluorescence non spécifique : autofluorescence, accumulation du colorant par défaut d'adhérence des coupes, fluorochromes libres, protéines fluorescentes non immunes.

Les tissus présentent une fluorescence naturelle, due essentiellement au conjonctif, de couleur vert bleuté. Cette autofluorescence s'accroît avec le temps, et devient très gênante pour l'expérimentation lors de la conservation prolongée des pièces congelées. Ce fait a guidé le choix du colorant que nous avons utilisé. La rhodamine donne une fluorescence rouge qui, grâce au filtre secondaire presque incolore de notre équipement de microscopie de fluorescence, est tout à fait distincte de la fluorescence naturelle. De plus, nous étudions les tissus aussi rapidement que possible après leur prélèvement. Le problème de l'autofluorescence est ainsi facilement résolu.

Il en est de même de celui que nous posait le défaut d'adhérence des coupes et des frottis sur les lames. Les traitements que subissent les préparations sont longs, et peuvent entraîner leur décollement, malgré la douceur des manipulations. Nous avons pensé longtemps que certaines plages intensément fluorescentes, observées au niveau des zones nécrotiques de la tumeur, pouvaient être dues à l'infiltration des colorants entre la lame et la préparation, en raison d'une éventuelle mauvaise adhérence de ces régions. En fait, les témoins ne présentaient pas cet aspect, en regard des parties mal adhérentes des préparations, qu'il s'agisse des organes normaux ou nécrotiques recouverts de sérum immun, ou bien de tumeur recouverte de sérum non immun. Il s'agissait donc bien d'une réaction immunologique repérant spécifiquement les plages nécrotiques.

Un problème plus complexe nous a été posé par la présence de rhodamine libre dans le sérum fluorescent : rhodamine non fixée au départ, ou libérée au cours de la conservation, ou encore absorbée sur des protéines de l'antisérum, sans liaison chimique vraie, donc échangeable. Il faut donc purifier le sérum fluorescent.

Le colorant libre est éliminé par des passages répétés du sérum sur des colonnes de Séphadex, et d'échangeurs d'ions (Amberlite). L'absorption sur poudre de tissus complète cette purification. Enfin, les produits conservateurs : merseptyl, azide de sodium, évitent les proliférations microbiennes et diminuent la libération des colorants et la fragilité des réactifs. On parvient donc à éliminer les colorants libres de l'antisérum en assurant une meilleure conservation des réactifs et en le purifiant à plusieurs reprises.

La rhodamine, ajoutée à l'antisérum pour le rendre fluorescent, se fixe indifféremment sur toutes les protéines présentes, y compris les protéines non immunes. Parmi celles-ci, certaines sont susceptibles de se fixer sur des protéines cellulaires de charges électriques opposées par un simple phénomène physico-chimique et sans qu'une réaction immunologique vraie soit en jeu. C'est le cas, en particulier, de la fraction albuminique des antisérums. Pour diminuer ces causes de fluorescence non spécifique, nous n'avons conservé que la fraction globulinique des antisérums. De plus, les absorptions répétées sur poudre de tissus fixent la plupart de ces protéines non immunes. Enfin, la comparaison avec un sérum fluorescent non immun permet de tenir compte, dans l'interprétation des résultats, de la fluorescence non spécifique qui serait demeurée malgré les diverses purifications.

La coloration obtenue n'est donc pas due à des phénomènes physiques ou chimiques non spécifiques, ni à des phénomènes d'autofluorescence : nous avons pu les éliminer ou les distinguer. Il s'agit bien d'une réaction immunologique puisque seul l'immunsérum colore la tumeur.

## II - SPECIFICITE DE LA REACTION

Il convient de rechercher dans quelle mesure cette réaction est spécifique du tissu tumoral. L'antisérum fluorescent, non absorbé, mis en présence de tissu normal et de tissu cancéreux, se fixe sur les deux types de préparation (avec, il est vrai, une affinité plus grande pour le tissu néoplasique). Le lapin a donc formé des anticorps contre l'espèce rat.

Il fallait étudier les résultats de l'absorption du sérum sur des poudres d'organes et de plasma de rat. Si nous n'avions plus observé de colorations après une telle épreuve, les anticorps auraient simplement été dirigés contre

le rat normal. Dans le cas contraire, il existerait un anticorps spécifique de la tumeur. Nous avons effectivement vérifié que l'absorption sur organes normaux de rat et sur plasma diminue la teneur en anticorps du sérum immun. Celui-ci ne marque plus les tissus normaux et un peu moins intensément les tissus tumoraux, qui restent cependant colorés.

Après absorption sur poudre de tissu tumoral, la fluorescence spécifique disparaît presque totalement. Il persiste cependant une coloration de fond rougeâtre. Rappelons que l'absorption sélective d'un immunosérum fluorescent est rarement totale (93).

Le rôle de l'absorption est donc très important. Non seulement, elle est capable de débarrasser le sérum de ses impuretés : colorant libre, protéines non immunes marquées, mais, soigneusement choisie, elle permet une sélection des anticorps. Les organes de rat absorbent les anticorps anti-espèce, si bien que l'immunosérum ne colore plus aucune préparation d'organe normal (rein, foie, thymus, etc...) ou d'organe nécrotique non tumoral (rein, rate). La poudre de tumeur, ensuite, absorbe les anticorps antitumeur, et le sérum ne colore qu'indistinctement la tumeur et sa nécrose. L'antisérum contient donc des anticorps spécifiquement antitumoraux, induits chez le lapin par la fraction microsomiale des cellules néoplasiques. Il serait souhaitable de pouvoir déterminer la nature de l'antigène responsable.

### III - NATURE DE L'ANTIGÈNE

Nous avons choisi les microsomes comme matériel antigénique. Mais les procédés de fractionnement par ultracentrifugation différentielle ne séparent pas les organites cellulaires de façon absolument rigoureuse. Chaque fraction est plus ou moins contaminée par celles qui la précèdent ou qui la suivent. De plus, le tissu tumoral n'est pas homogène, mais renferme en plus des cellules tumorales proprement dites, intactes ou nécrotiques, un stroma conjonctif. Les fractions de ces divers éléments peuvent donc se retrouver dans l'antigène injecté.

Il peut s'agir d'abord d'éléments tumoraux non microsomaux. Les cellules entières, non broyées, les noyaux et les mitochondries, sont éliminés dans le premier temps de la centrifugation. Mais noyaux et mitochondries peuvent être broyés en plus petits fragments, susceptibles de sédimenter en même temps que les microsomes.

Les microsomes sédimentent tous, puisque la vitesse de centrifugation est calculée justement pour les isoler.

La fraction post-microsomiale est entraînée en partie avec les microsomes.

le suc cytoplasmique forme le surnageant. Mais le sédiment peut en retenir une certaine quantité.

La nécrose, enfin, difficile à déterminer exactement, qui contient des débris de toutes catégories, est sans aucun doute présente dans le culot microsomial.

Des éléments non tumoraux peuvent aussi être isolés. Nous pouvons écarter le conjonctif et le stroma : à part la coque conjonctive, éliminée avant l'homogénéisation, la trame fibrillaire est presque inexistante dans la tumeur. Par contre, les liquides extracellulaires, et en particulier la fibrine plasmatique, peuvent être entraînés avec les microsomes.

Enfin, des virus, éventuellement présents, sédimenteraient avec les microsomes : ils ont les mêmes dimensions et la même densité que ces particules cytoplasmiques.

En résumé, la fraction microsomiale peut contenir, outre les microsomes, une faible proportion de fragments nucléaires et mitochondriaux, une partie de la fraction post-microsomiale, de la fibrine, et surtout de la nécrose d'origine tumorale.

Examinons maintenant les antigènes marqués par le sérum immun.

Le tissu conjonctif et les vaisseaux ne sont pas marqués.

Les organes normaux sont marqués : il y a eu formation d'anticorps anti-espèce. La technique de double diffusion en gélose confirme d'ailleurs la communauté antigénique entre les microsomes normaux et tumoraux. Après absorption sur tissu normal, les organes sains ne présentent plus aucune coloration : l'antigène spécifique ne se trouve pas dans les organes normaux.

Après absorption sur plasma de rat, l'ensemble de la préparation ne présente qu'une légère diminution de son intensité. Les anticorps antifibrine ne sont donc pas seuls responsables du marquage de la tumeur. Dans celle-ci, seul le cytoplasme retient l'immunsérum fluorescent, les noyaux ne sont pas marqués. De plus, les cellules tumorales les plus jeunes sont à peine colorées, et la fixation de l'immunsérum est d'autant plus intense que les cellules sont plus proches de la nécrose. Il semble donc bien que ce soit dans ces cellules nécrobiotiques que se trouve l'antigène responsable du marquage du tissu tumoral. Il ne s'agit pas du marquage de la nécrose en tant que telle, car les préparations

des tissus nécrotiques non tumoraux sont à peine fluorescentes, mais bien d'une fixation spécifique sur la nécrose tumorale.

Il peut s'agir d'un antigène apparaissant au cours de la maturation des cellules, et libéré au cours de leur dégénérescence. Ce pourrait être le cas d'un virus, éventualité que nous ne pouvons totalement exclure. Nous pouvons également avoir affaire à des antigènes de nécrose, résultant du démasquage des déterminants antigéniques internes des molécules protéiques, fragmentées par la nécrose : cette hypothèse nous paraît la plus probable.



## CONCLUSION

Les difficultés que nous avons rencontrées sont de deux ordres. Elles tiennent d'abord à la technique d'immunofluorescence elle-même, qui nécessite une élimination aussi parfaite que possible des nombreuses causes de fluorescence non spécifique. Elles tiennent surtout au principe même de l'immunologie des tumeurs.

Le choix des antigènes est délicat, les critères de ce choix étant difficiles à déterminer. Les fractions cellulaires ont un pouvoir antigénique faible, elles provoquent la formation d'anticorps de titre peu élevé qui ne peuvent être dilués, ce qui augmente le risque de fluorescences non spécifiques. De plus, les antigènes des tissus tumoraux ont une parenté très étroite avec ceux des tissus normaux ; on pourrait dire que la plupart de leurs antigènes sont communs, et que nous ne connaissons pas la fraction cellulaire qui contient les caractères antigéniques propres à la tumeur.

La production des anticorps est confiée à un animal qui reçoit des inoculations de fractions cellulaires antigéniques. La réponse est variable suivant les individus, au sein d'une même espèce. L'élaboration d'anticorps se fait d'abord contre les antigènes les plus puissants, tels ceux d'origine sérique, même s'ils ne contaminent que faiblement la fraction injectée.

Les anticorps obtenus doivent être dénombrés et caractérisés. Par la méthode d'immunofluorescence, ce n'est qu'indirectement qu'il est possible de séparer certains anticorps les uns des autres : absorption sélective répétée, absorption-élution. La double diffusion en gélose aurait permis l'analyse de l'antisérum, si les antigènes étudiés s'étaient révélés diffusibles. Une solution à ce problème de la séparation des anticorps pourrait être l'inoculation des antigènes tumoraux directement à des rats, consanguins avec les porteurs de tumeur. Il y a certainement une réponse à une telle sollicitation : nous avons inoculé des cellules tumorales trypsinées à des rats dans le but d'obtenir une modification de la croissance d'une tumeur greffée ultérieurement. Nous avons effectivement constaté une activation de la croissance. A l'époque où nous avons fait cette expérience, nous n'avons pu étudier le sérum des rats. Mais nous nous proposons de reprendre ce travail.

La dernière difficulté est la démonstration de la spécificité d'un antigène, celle-ci ne pouvant être qu'indirecte : sérum non immun, préparation de tissus normaux témoins, absorption progressive. Les problèmes posés par les nombreuses interférences immunologiques et par la purification du sérum humain, ont pu être surmontés. Nous avons pu mettre en évidence la présence d'un antigène spécifiquement tumoral.

Mais sa nature n'a pu être entièrement éclaircie, et il a été impossible de la rattacher à une structure cellulaire bien définie, et par conséquent de l'isoler. De plus, il ne nous a été possible de marquer les cellules tumorales que lorsqu'elles sont parvenues à un degré de maturation avancée. Il eut été, évidemment, satisfaisant de repérer ces cellules dès leur formation. Ce fait est un phénomène général déjà observé pour d'autres lignées cellulaires telles que les plasmocytes. Alors que les cellules mûres sont riches en antigènes et fixent intensément les immunsérums fluorescents, les stades les plus jeunes de la lignée présentent une immaturité antigénique, responsable de leur absence de marquage.

En dépit de ces restrictions, le marquage spécifique des cellules tumorales présente un intérêt certain. Sans prétendre se substituer aux techniques morphologiques qui gardent une place primordiale dans le diagnostic des tumeurs malignes, il peut contribuer à identifier les lésions douteuses du point de vue clinique et morphologique. Il pourrait même permettre une localisation de ces lésions *in vivo* (102, 103). Et, dans cette voie, on peut envisager l'emploi d'anticorps non plus marqués par la rhodamine, mais conjugués à des agents thérapeutiques, qui seraient conduits jusqu'aux lésions à traiter.

Bien des difficultés sont encore à résoudre avant que l'on puisse mettre en pratique de telles méthodes en cancérologie humaine. Les tumeurs expérimentales permettent seules de sérier ces problèmes et de les résoudre ; car, à la différence des tumeurs humaines, elles représentent des modèles expérimentaux reproductibles. En particulier, l'étude de tumeurs provoquées, plus proches du cancer humain, peut contribuer efficacement aux progrès dans le domaine qui nous préoccupe.

## TECHNIQUES

Nous envisageons les différentes techniques suivant l'ordre approximatif de leur utilisation : la préparation des antigènes, l'immunisation et le recueil des anticorps, la conjugaison des sérums avec les fluorochromes, l'utilisation des immunosérums fluorescents, la préparation des poudres tissulaires destinées à l'absorption des préparations d'immunosérums fluorescents.

### I - PREPARATION DES ANTIGENES

Une tumeur est prélevée et débarrassée des parties nécrotiques chez un animal tué par anesthésie à l'éther. L'animal est préalablement saigné et perfusé avec une solution isotonique pour éliminer le sang contenu dans les vaisseaux de la tumeur. Ce "lavage" n'est pas aussi efficace qu'on le désirerait, car la tumeur est mal vascularisée.

#### a) Première méthode de centrifugation différentielle.

La tumeur est découpée aux ciseaux en menus fragments et recouverte de saccharose en solution à 0,25 M. Elle est homogénéisée dans l'appareil de POTTER pendant deux minutes. Le broyat obtenu est centrifugé à 700 g pendant dix minutes. Le surnageant est conservé et le culot est repris par la solution de saccharose, homogénéisé et centrifugé à nouveau. Cette opération est répétée une fois encore.

Les volumes de solution de saccharose utilisés seront choisis de telle façon qu'on obtienne une suspension tissulaire au dixième. Le culot obtenu après ces trois lavages est constitué de fragments de tissu non broyés, de fibres conjonctives, de cellules entières, et de noyaux. Ceux-ci forment une couche blanchâtre au-dessus des autres éléments déposés au fond du tube.

Les surnageants des trois centrifugations sont réunis et centrifugés dix minutes à 20 000 g (ultracentrifugeuse SPINCO, modèle L, rotor 30). Le surnageant de cette centrifugation est conservé. Les culots sont réunis, remis en

suspension dans le saccharose 0,25 M, centrifugé à 20 000 g ; cette opération est répétée encore une fois, le culot obtenu représente la fraction mitochondriale de la tumeur.

Les trois surnageants sont réunis et centrifugés soixante minutes à 57 000 g (rotor 40). Les surnageants sont réunis. Ils représentent la fraction cytoplasmique soluble. Les culots, formés des microsomes, sont réunis en suspension dans le saccharose et centrifugés à nouveau soixante minutes à 140 000 g. Le surnageant de cette centrifugation est rejeté et le culot microsomial est remis en suspension dans un volume égal de saccharose isotonique.

L'ensemble de cette opération est réalisée à la chambre froide à une température située entre 2 et 4°. Les centrifugations sont effectuées en centrifugeuse réfrigérée.

#### b) Deuxième méthode de centrifugation différentielle (selon D'AMELIO et PERIMAN).

Cette méthode a servi à la préparation des antigènes utilisés pour les tests, en immunofluorescence et en double diffusion sur gélose.

La tumeur, découpée en petits fragments et débarrassée des éléments nécrotiques et conjonctifs, est homogénéisée dans du saccharose 0,44 M. Les cellules entières, les débris, les noyaux, sont éliminés par centrifugation à 20 000 g durant 30 minutes. Ensuite, les microsomes sont sédimentés par centrifugation à 105 000 g pendant 60 minutes. Ils sont utilisés ainsi, ou traités par le désoxycholate.

Les microsomes sédimentés sont resuspendus en saccharose, traités par le désoxycholate de sodium à la concentration finale de 0,4 % et à nouveau centrifugés deux heures à 105 000 g. Dans le but de diminuer la contamination de la fraction soluble par les granules nucléoprotéiques qui forment le culot, seul le tiers supérieur du surnageant est repris et centrifugé à nouveau 2 à 5 heures à 105 000 g. On obtient ainsi l'extrait désoxycholique des microsomes.

Le sédiment insoluble dans le désoxycholate, obtenu après élimination de la fraction soluble, est lavé par du saccharose 0,44 M et à nouveau centrifugé 2 à 5 heures à 105 000 g. Pour les tests, le sédiment est resuspendu dans deux millilitres de saccharose 0,25 M.

Après élimination des microsomes, le tiers supérieur du surnageant est recueilli et centrifugé à nouveau pendant cinq heures à 105 000 g pour purification. La fraction obtenue est assimilée au suc cytoplasmique.

## II - IMMUNISATION

La suspension de microsomes provenant de cinq grammes de tumeur est mélangée à cinq millilitres d'adjuvant de FREUND (Bacto-adjuvant-Difco, complet) et répartie en ampoules ou en tubes stériles qui sont conservés au congélateur à  $-20^{\circ}$ . Pour la dernière série d'immunisation, nous avons préféré ne pas conserver ce mélange et d'utiliser aussitôt après sa préparation.

Les lapins reçoivent une injection sous-cutanée par semaine durant six semaines, en variant les points d'injection. La première injection est de 0,5 millilitres. Les suivantes de 1 millilitre. Le sérum est prélevé avant immunisation, pour servir de témoin, et une semaine après la dernière injection. Le sang est prélevé habituellement à la veine marginale de l'oreille, parfois à l'artère médiane. Quand la quantité de sang recueilli est insuffisante, nous pratiquons une ponction cardiaque.

## III - CONJUGAISON DES SERUMS AVEC LES FLUOROCHROMES

Le caillot est décanté, le sang est centrifugé, et on recueille le sérum. Un volume de sérum est dilué dans 2 volumes de tampon carbonate 0,5 M à p H 9,0. Le mélange est refroidi aux environs de son point de congélation et on ajoute lentement sous agitation continue un volume de solution acétonique de chlorure de sulforhodamine égal au dixième du volume initial du sérum. L'agitation est poursuivie pendant une nuit dans un bain de glace. Il se forme en général un précipité assez abondant que l'on élimine par une centrifugation de 10 minutes à 15 000 t/mn. Le surnageant est passé sur une colonne de Séphadex G 50 M pour éliminer le tampon et l'excès de colorant. La fraction globulinique du sérum conjugué purifié est précipitée par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Après centrifugation de 10 minutes, à 15 000 t/mn, le surnageant est rejeté, et le précipité de globuline est redissout dans le volume minimum de chlorure de sodium 0,14 M tamponné par du phosphate 0,01 M à p H 7,2.

La solution de globulines conjuguées est débarrassée du sulfate d'ammonium par passage sur colonne de Séphadex G 50 M, puis les dernières traces de fluorochrome sont éliminées par chromatographie sur une colonne d'Amberlite C G 400.

### Préparation de la solution acétonique de sulforhodamine.

0,500 grammes de rhodamine R B 200 sont triturés dans un tube à centrifuger en verre épais pyrex avec 1 gramme de pentachlorure de phosphore

pendant plusieurs minutes, à l'aide d'un agitateur en verre solide. Une fois la réaction mise en route, on ajoute petit à petit 5 millilitres d'acétone anhydre. On continue à triturer le mélange pendant plusieurs minutes jusqu'à la fin de la réaction, puis on centrifuge à 3 000 t/mn pendant 10 minutes. Le surnageant représente la solution acétonique de chlorure de sulfo-rhodamine utilisée pour la conjugaison des immunosérums. Elle peut être conservée quelques semaines en tubes parfaitement bouchés et à -20°.

#### IV - UTILISATION DES IMMUNOSÉRUMS FLUORESCENTS

Les immunosérums sont utilisés soit sur des frottis ou empreintes d'organes, soit sur des coupes de tissus non fixés, obtenus par congélation. Pour réduire la fluorescence non spécifique (colorant libre ou anticorps spécifiques d'espèce) les immunosérums sont mis en contact pendant 30 minutes avec des poudres acétoniques d'organes, ou des poudres de tissus lyophilisés (100 mg/ml de sérum). Les sérums ainsi traités se conservant mal, l'absorption est effectuée immédiatement avant utilisation. Nous la répétons habituellement deux fois.

Les frottis ou empreintes d'organes sont fixés pendant 3 minutes à l'alcool éthylique à 95° à température ordinaire, soit après dessiccation, soit à l'état humide. Après fixation, l'alcool est éliminé par trois bains de 5 minutes chacun dans du sérum physiologique tamponné (NaCl 0.14M tamponné phosphate 0.01M p H 7,2). Les frottis sont ensuite recouverts de sérum fluorescent qu'on laisse réagir pendant 30 minutes en chambre humide. L'excès de sérum fluorescent est éliminé par au moins trois bains de cinq minutes chacun en sérum physiologique tamponné.

Les préparations sont montées sous lamelles, en sérum physiologique. Pour éviter la dessiccation, les lamelles sont lutées à l'aide de sirop d'Apathy.

Pour les coupes de pièces congelées, les tissus découpés en petits fragments de deux à trois millimètres d'épaisseur sont congelés dans l'azote liquide. Ils peuvent être conservés quelques jours. Les coupes sont effectuées "au" cryostat, leur épaisseur varie entre 3 et 10 microns. En général, nous coupons à 5 microns. Collées directement sur la lame, elles sont utilisées sans fixation ou après passage par l'alcool à 95° ou l'acétone, puis traitées comme les frottis. Une lame sur deux est conservée pour une coloration classique, hémalum, éosine, bleu d'aniline.

Pour chaque essai, on compare les résultats donnés par un sérum de lapin normal rendu fluorescent et par le sérum obtenu après immunisation.

## V - PRODUITS UTILISES

- Amberlite C G 400, tamis 200/400  
TOUZART et MATIGNON, 3 rue Amyot - PARIS 5ème.
- Séphadex G 50 M : Pharmacia AB, Uppsala, SWEDEN.
- Rhodamine R B 200 : G. T. Gurr Ltd. New King's Road, London, SW 6 ou  
Rose sulfacide brillant 3 B quadruple :  
Compagnie Française des matières colorantes  
9, avenue Georges V - PARIS 8ème.
- Adjuvant de Freund
- Tampon carbonate p H 9,0 - 0,5 M :

|                                               |     |     |
|-----------------------------------------------|-----|-----|
| NaHCO <sub>3</sub> .....                      | 3,7 | g   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhydre ..... | 0,6 | g   |
| Eau distillée q. s. p. ....                   | 100 | ml. |
- Sérum salé physiologique tamponné :

|                                                             |      |    |
|-------------------------------------------------------------|------|----|
| Cl Na .....                                                 | 8,5  | g  |
| Na <sub>2</sub> HPO (anhydre) .....                         | 1,07 | g  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O ..... | 0,39 | g  |
| Eau distillée q. s. p. ....                                 | 1    | l. |

## VI - PREPARATION DES POUDRES TISSULAIRES POUR ABSORPTION DES PREPARATIONS D'IMMUNSERUMS FLUORESCENTS

1. - Placer dans un homogénéiseur Waring, 25 à 50 g de tissus frais et un volume égal de NaCl 0,15 M. Homogénéiser par périodes brèves mais répétées, en évitant tout réchauffement.
2. - Verser l'homogénat dans un bécher et ajouter quatre volumes d'acétone sous agitation. Laisser reposer quelques minutes, décanter et rejeter le surnageant.
3. - Rassembler le précipité par centrifugation, en changeant plusieurs fois la solution saline, jusqu'à ce que le surnageant soit débarrassé d'hémoglobine.
4. - Remettre en suspension le précipité lavé dans un volume égal de solution saline, et à la suspension, ajouter quatre volumes d'acétone, en agitant.

5. - Laisser sédimenter quelques minutes, décanter le surnageant et le rejeter sur un büchner sous aspiration. Laver le précipité à l'acétone et le laisser sécher sur le büchner à l'étuve réglée sur 37°. Conserver la poudre obtenue dans un flacon bouché au réfrigérateur à + 4°.

## VII - LYOPHILISATS

Préférés actuellement aux poudres d'organes, mais à conservation plus limitée, les tissus, hétérologues, sont homogénéisés comme précédemment, mais dans de l'eau distillée, décantés, lavés jusqu'à ce qu'ils soient à peu près débarrassés d'hémoglobine, puis lyophilisés. Conservés au froid en flacons bouchés.

## VIII - CONSERVATION DES ANTISERUMS ABSORBES SUR POUDRE DE TISSU

Mauvaise. On ne prépare que de petits aliquots de 1 à 5 ml, suffisants pour l'utilisation immédiate. On ajoute 100 mg de poudre de tissu à 1 ml de solution d'anticorps fluorescents contenus dans un tube. On laisse reposer 30 minutes à température du laboratoire en agitant de temps en temps avec un petit agitateur. Le surnageant est recueilli par centrifugation à 600 g pendant 10 minutes. La procédure d'absorption est habituellement répétée en utilisant une autre poudre, ou la même poudre tissulaire. On ajoute du Merthiolate (1°/ooo) au surnageant et le conjuguat purifié est conservé à + 4°.

## IX - TECHNIQUE DE LA DOUBLE DIFFUSION EN GELOSE SELON OUCHTERLONY

### a) Produits utilisés

sérum salé à 8,5°/oo  
tampon glycocolle 0,5 M  
merseptyl 1 %  
EDTA (complexon III) 1°/oo  
gélose

### b) Technique

On mélange un volume de sérum physiologique à un volume de glycocolle 0,5 M. On y ajoute 1 % de merseptyl et 0,2 g d'EDTA. On ajuste le p H à 7,2 à l'aide de soude. Enfin, on ajoute 1 % de gélose à la solution obtenue.

Le produit est mis à fondre au bain-marie puis coulé dans une boîte de Pétri sur une hauteur de 4 à 5 mm. On laisse prendre la gélose pendant quelques heures, avant de pratiquer de petites cavités circulaires de douze millimètres de diamètre distantes les unes des autres de 10 mm, destinées à recevoir les différents antigènes et l'immunsérum.

Les boîtes seront conservées 30 jours après le dépôt des solutions antigéniques étudiées dans les différentes cavités, et les lignes de précipitation, leur ordre d'apparition et de disparition, soigneusement observées.



## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BALDWIN (R.W.)  
Immunity to transplanted tumour : the effect of tumour extracts on growth of homologous tumours in rats.  
*Brit. J. Cancer*, 1955, 9, 646-651.
- 2 - BALDWIN (R.W.)  
Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of implanted tumours.  
*Brit. J. Cancer*, 1955, 9, 652-657.
- 3 - BASHFORD (E.F.)  
The investigations of the imperial cancer research fund.  
*Brit. Med. J. London*, 1906, 2, 1554.
- 4 - BESREDKA (A.)  
Essai de vaccination contre le cancer experimental.  
*Presse Med.*, 1935, 43, 1977-1979.
- 5 - BESREDKA (A.), BARDACH (M.)  
De l'immunisation des lapins par la voie intracutanée contre l'épithélioma inoculé dans l'oeil.  
*C. R. Acad. Sci.*, 1936, 202, 2193-2194.
- 6 - BESREDKA (A.), MAGAT (I.), LAVAL (P.), BESNARD (P.)  
De la vaccination intracutanée contre l'épithélioma de Pearce Brown.  
*C. R. Acad. Sci.*, 1935, 201, 690-692.
- 7 - BJÖRKLUND (B.)  
Antigenicity of malignant and normal human tissues by gel diffusion techniques.  
*Int. Arch. Allergy*, 1956, 8, 179-192.
- 8 - BJÖRKLUND (B.), GRAHAM (J.B.), GRAHAM (R.M.)  
Effect of horse antihuman cancer serum on malignant and normal human cells ; preliminary report  
*Int. Arch. Allergy*, 1957, 10, 56-64.

- 9 - BLAU (M.), DAY (E.D.), PLANINSEK (J.), PRESSMAN (D.)  
Specificity and cross-localization of antikidney antibodies.  
J. Immunol., 1957, 79, 334-336.
- 10 - BORREL (M.)  
Epithélioses infectieuses et épithéliomas.  
Ann. I. P., 1903, 17, 81-122.
- 11 - BOYDEN (S.V.)  
Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.  
J. Exp. Med., 1951, 93, 107-120.
- 12 - BRIDRE (J.)  
Recherches sur le cancer expérimental des souris.  
Ann. I. P., 1907, 21, 760-776.
- 13 - BURMESTER (B.R.)  
Cytotoxic effect of avian lymphoid tumor antiserum.  
Cancer Research, 1947, 7, 459-467.
- 14 - CASEY (A.E.)  
Inhibition of Brown Pearce rabbit tumor with filtered homologous tumor material.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1936, 34, 111-112.
- 15 - CHARCOT (J.B.)  
Quelques faits relatifs à des recherches sur la sérothérapie du cancer.  
C. R. Soc. Biol., 1902, 54, 15-16.
- 16 - CLAUDE (A.)  
Fractionnation of mammalian liver cells by differential centrifugation ; experimental procedures and results.  
J. Exp. Med., 1946, 84, 61-89.
- 17 - CLAUDE (A.)  
Fractionnation of mammalian liver cells by differential centrifugation ; problems, method and preparation of extract.  
J. Exp. Med., 1946, 84, 51-59.
- 18 - COONS (A.H.), KAPLAN (M.H.)  
Localization of antigen in tissue cells ; improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody.  
J. Exp. Med., 1950, 91, 1-13.

- 19 - COONS (A.H.), LEDUC (E.H.), CONNOLLY (J.M.)  
Studies on antibody production ; method for histochemical demonstration of specific antibody and its application to study of the hyper immune rabbit.  
J. Exp. Med., 1955, 102, 49-60.
- 20 - D'AMELIO (V.), PERLMAN (P.)  
The distribution of soluble antigens in cellular structures of rat liver.  
Exp. Cell Research, 1960, 19, 383-398.
- 21 - DAY (E.D.), PLANINSEK (J.A.), PRESSMAN (D.)  
Localization in vivo of radio iodinated antirat fibrin antibodies and radio iodinated rat fibrinogen in the Murphy rat lymphosarcoma and in other transplantable rats tumors.  
J. Nat. Cancer Inst., 1959, 22, 413-426.
- 22 - DAY (E.D.), PLANINSEK (J.A.), PRESSMAN (D.)  
Localization of radio iodinated antibodies in rats bearing tumours induced by N<sub>2</sub>-fluorenyl-acetamide.  
J. Nat. Cancer Inst., 1960, 25, 787-802.
- 23 - DAY (E.D.), PLANINSEK (J.A.), PRESSMAN (D.)  
Specific localization in vivo of antihepatoma antibodies in autochthonous rat hepatomas.  
J. Nat. Cancer Inst., 1961, 27, 1107-1114.
- 24 - DAY (E.D.), PLANINSEK (J.A.), PRESSMAN (D.)  
Triadic labelling with I<sub>130</sub>, I<sub>131</sub>, and I<sub>133</sub>, for controlled determinations of tumor-localizing antibodies.  
J. Nat. Cancer Inst., 1961, 26, 1321-1334.
- 25 - DODD (M.C.), BIGLEY (N.J.), GEYER (V.B.), Mac COY (F.W.), WILSON (H.E.)  
Auto immuneresponse in rabbit injected with rat and rabbit liverribosomes.  
Sciences, 1959, 137, 688-689.
- 26 - DOR (L.)  
Principes généraux qui doivent conduire à la découverte des sérums anticancéreux.  
Gaz. Heb. Med. Chir., 1900, 11, 232.
- 27 - DOSNE de PASQUALINI (C.), HOLMBERG (E.D.), RABASA (S.L.), PAVLOVSKY (A.)  
Immunité au sarcome 180.  
C. R. Soc. Biol., 1961, 155, 176-177.

- 28 - DUFOUR (D.)  
Mise en évidence d'un facteur antigénique spécifique de la cancérisation.  
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1963, 8, 171-172.
- 29 - DUFOUR (D.), LINH (D.B.)  
Production d'isoanticorps contre le sérum de rat porteur de la tumeur de Walker, chez le rat normal.  
Laval Med., 1960, 29, 517-520.
- 30 - DUFOUR (D.), LINH (D.B.)  
Sensibilisation immunologique du rat à la tumeur de Walker.  
Laval Med., 1962, 33, 351-354.
- 31 - DUFOUR (D.), LINH (D.B.)  
Spécificité de l'antigène tumoral décelé dans le foie de rat porteur d'une tumeur de Walker.  
Experientia, 1962, 18, 372-373.
- 32 - DUFOUR (D.), LINDSAY (P.), LINH (D.B.)  
Cycle de l'antigène cancéreux spécifique de la tumeur de Walker.  
Bull. Ass. Franç. Cancer, 1961, 48, 455-460.
- 33 - DUHEILLE (J.), HERBEUVAL (H.), FOUROT (M.)  
Cytodiagnostic immunologique des plasmocytes en leucoconcentration.  
C. R. Soc. Biol., 1963, 157, 591-594.
- 34 - DUHEILLE (J.), HERBEUVAL (H.), HERBEUVAL (R.)  
Mise en évidence, par immunofluorescence, des plasmocytes sanguins en leucoconcentration.  
9ème Congrès de la Société Européenne d'Hématologie, Lisbonne, 26. 31/8/63.
- 35 - DUHEILLE (J.), HERBEUVAL (R.), HERBEUVAL (H.)  
Diagnostic des mégacaryoblastémies par l'immunofluorescence.  
Nou. Rev. Franç. Hématol., 1962, 2, 621-625.
- 36 - DUX (K.), RYZEWSKA (A.), CZARNOMSKA (A.)  
Mechanism of antigen transformation of transplantable rat tumour.  
Nature, 1961, 190, 458-459.
- 37 - EHRLICH (H.)  
Experimentelle carcinostudien an Mäuser.  
Ztschr. f. Ärztl. Fortbild Jena, 1906, 3, 205-213.

- 38 - **Extrait** du rapport du VIIIème congrès international du Cancer,  
Moscou, 22-28 juillet 1962.  
Immunologie et génétique des tumeurs.  
*Acta Un. Intern. Cancrum*, 1963, 19, 63-213.
- 39 - ENGEL (C.S.)  
Ueber Komplementbindungsversuche mit dem Blute Krebskranker.  
*Ztschr. f. Krebsforsch*, 1910-1911, 10, 248-250.
- 40 - FLEXNER (S.), JOBLING (J.W.)  
Infiltrating and metastasing sarcoma of the rat.  
*J. Amer. Med. Assoc.*, 1907, 48, 420.
- 41 - FOLEY (E.J.)  
Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin.  
*Cancer Research*, 1953, 13, 835-837.
- 42 - GAY (F.P.)  
A transmissible cancer of the rat considered from the standpoint of immunity.  
*J. Med. Research*, 1909, 20, 175-201.
- 43 - GIRARD (Pierre), PEYRE (E.), BOURSAUS (H.)  
Différenciation, par leur fonction antigène, des tissus normaux et du tissu néoplasique chez le rat.  
*C. R. Soc. Biol.*, 1931, 107, 20-23.
- 44 - GIRARD (Pierre), PEYRE (E.), BOURSAUS (H.)  
Sensibilisation par différents tissus cancéreux humains.  
*C. R. Soc. Biol.*, 1932, 111, 843-844.
- 45 - GORER (P.A.)  
The significance of studies with transplanted tumours.  
*Brit. J. Cancer*, 1948, 2, 103-107.
- 46 - GREEN (H.M.), WILSON (R.)  
Further observations on tumour enhancing factors : their bearing on the immunological theory of cancer.  
*Nat. London*, 1958, 182, 1054-1058.
- 47 - GREEN (R.G.)  
Species characters of cancer cells.  
*Science*, 1947, 107, 93.

- 48 - GUERIN (M.), GUERIN (P.)  
Epithélioma de l'utérus du rat, lymphotrope et transplantable.  
Bull. Cancer, 1934, 23, 632-646.
- 49 - HAALAND (M.)  
Beobachtungen über natürliche Geschwulstresistenz bei Mäusen.  
Berlin Klin. Wchnschr., 1907, 49, 713-719.
- 50 - HAUSCHKA (T.S.)  
Immunologie aspects of cancer : a review.  
Cancer Research, 1952, 12, 615-633.
- 51 - HERBEUVAL (R.), HERVEUVAL (H.)  
Technique de concentration leucocytaire pour la mise en évidence des cellules anormales dans le sang.  
C. R. Acad. Sci., 1960, 250, 3070-3072.
- 52 - HERBEUVAL (R.), DUHEILLE (J.), BELLUT (F.)  
Etude, par immunofluorescence, des propriétés antigéniques de l'épithélioma atypique du rat T 8 de Guérin.  
C. R. Acad. Sci., 1964, 258, 2938-2941.
- 52 - HERBEUVAL (R.), DUHEILLE (J.), GUERCI (O.), CUNY (G.), MIBIS) DON (J.)  
Diagnostic d'un cancer au rein par cathétérisme de la veine cave en leucoconcentration.  
Ann. Med. Nancy, 1962, 10, 630-637.
- 53 - HERBEUVAL (H.), HERVEUVAL (R.), DUHEILLE (J.)  
Le passage, dans le sang circulant, des amas hématopoïétiques, îlots érythroblastiques, îlots mégacaryoblastiques, îlots mixtes.  
Nouv. Rev. Franç. Hématol., 1962, 2, 616-619.
- 54 - HERBEUVAL (H.), HERBEUVAL (R.), DUHEILLE (J.)  
Passage d'îlots mégacaryoblastiques et érythroblastiques dans le sang circulant.  
C. R. Soc. Biol., 1962, 156, 126-129.
- 55 - HERBEUVAL (H.), HERBEUVAL (R.), DUHEILLE (J.)  
Technique de recherche des cellules cancéreuses dans le sang : la leucoconcentration.  
Triangle, 1963, 6, 47-52.

- 56 - HERBEUVAL (R.), HERBEUVAL (H.), DUHEILLE (J.)  
Particularités cytologiques des mégacaryocytes observés dans le sang périphérique.  
C. R. Soc. Biol., 1961, 155, 370-373.
- 56 - HERBEUVAL (R.), HERBEUVAL (H.), DUHEILLE (J.)  
(bis) Techniques nouvelles en leucoconcentration.  
Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss., 1964, 20, 27-47.
- 57 - HERBEUVAL (R.), DUHEILLE (J.), HERBEUVAL (C.), BELLUT (F.)  
Etude, par immunofluorescence, des auto-anticorps anti-thyroïdiens chez l'homme.  
C. R. Soc. Biol., 1964, sous presse.
- 58 - HERBEUVAL (R.), HERBEUVAL (H.), CUNY (G.), DUHEILLE (J.)  
Recherche des cellules cancéreuses dans le sang et les liquides d'exsudats par la leucoconcentration.  
Presse médicale 1961, 69, 149-152.
- 59 - HERBEUVAL (R.), DUHEILLE (J.), BELLUT (F.), BELLUT (M.),  
BERTRAND (M.)  
Etude immunologique de l'épithélioma atypique du rat T 8 de Guérin.  
I. Fraction microsomiale.  
C. R. Soc. Biol., 1964, sous presse.
- 60 - HERICOURT (J.), RICHET (C.)  
De la sérothérapie dans le traitement du cancer.  
C. R. Acad. Sci., 1895, 121, 567-569.
- 61 - HINGLAIS-GLIOT (N.), RIVIERE (M.), BERNHARD (W.)  
Présence de particules d'aspect viral dans un épithélioma utérin du rat.  
C. R. Acad. Sci., 1959, 249, 1589-1591.
- 61 - HIRAMOTO (R.), JURANDOWSKY (J.), BERNECKY (J.), PRESSMAN  
(bis) (D.)  
Immunohistochemical staining properties of the N<sub>2</sub> fluorenyl-acetamide induced Rat hepatoma.  
Cancer Research, 1961, 21, 1372-1376.
- 62 - HIRAMOTO (R.), PRESSMAN (D.)  
Immunohistochemical staining properties of human skin and some related tumors.  
Cancer Research, 1957, 17, 1135-1137.

- 63 - HIRAMOTO (R.), BERNECKY (J.), JURANDOWSKY (J.), PRES-  
SMAN (D.)  
Fibrin in human tumors.  
Cancer Research, 1960, 20, 592-593.
- 64 - HIRAMOTO (R.), JURANDOWSKY (J.), BERNECKY (J.), PRES-  
SMAN (D.)  
Immunochemical differentiation of rhabdomyosarcomas.  
Cancer Research, 1961, 21, 383-386.
- 65 - HIRAMOTO (R.), JURANDOWSKY (J.), BERNECKY (J.), PRES-  
SMAN (D.)  
Staining properties of antibodies prepared against microsomes from a rat  
N<sub>2</sub>-fluorenyl-acetamide-induced hepatoma.  
Proc. Am. Ass. Cancer Research, 1962, 3, 328.
- 66 - HIRAMOTO (R.), JURAND (J.), BERNECKY (J.), PRESSMAN (D.)  
Immunohistochemical differences among N<sub>2</sub>-fluorenyl-acetamide-induced.  
Rat hepatomas.  
Cancer Research, 1963, 23, 109-111.
- 67 - HUGUES (P.)  
Significance of staining reactions of preneoplastic rat liver with fluores-  
cein globulin complexes.  
Cancer Research, 1958, 18, 426-432.
- 68 - JENSEN (C.O.)  
Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen.  
Centralb. f. Bakteriол., 1903, 34, 28-34.
- 69 - KALISS (N.)  
The transplanted tumour as a research tool in cancer immunology.  
Cancer Research, 1961, 21, 1203-1208.
- 70 - KEPINOW (L.)  
De la résistance au cancer des souris préparées par injections répétées  
de tissu cancéreux chauffé.  
C. R. Soc. Biol., 1920, 83, 785-787.
- 71 - KIDD (J.G.)  
Serological studies in relation to problem of tumor causation.  
J. Bact., 1940, 39, 349-364.

- 72 - KIDD (J.G.)  
A distinctive substance associated with the Brown Pearce rabbit carcinoma. I. Présence and specificity of the substance as determined by serum reactions.  
J. Exp. Med., 1940, 71, 335-350.
- 73 - KIDD (J.G.)  
A distinctive substance associated with the Brown Pearce rabbit carcinoma. II. Properties of the substance : discussion.  
J. Exp. Med., 1940, 71, 351-371.
- 74 - KIDD (J.G.)  
Suppression of growth of Brown Pearce tumor cells by specific antibody, with consideration of nature of reacting cells constituent.  
J. Exp. Med., 1946, 83, 227-250.
- 75 - KLEIN (G.), SJÖGREN (H.O.), KLEIN (E.), HELLSTROM (K.E.)  
Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced in the primary autochthonous host.  
Cancer Research, 1960, 20, 1561-1572.
- 76 - KOENIGSFELD (H.)  
Ueber Versuche zur Immunisierung gegen Mäusekrebs.  
Centralb. f. Bakt., 1914, 73, 316-327.
- 77 - LAMBERT (R.A.)  
The influence of mouse rat parabiosis on the growth in rats of a transplantable mouse sarcoma.  
J. Exp. Med., 1911, 13, 257-262.
- 78 - LINH (D.B.), DUFOUR (D.)  
Etude de la "survie" des anticorps isologues antitumeurs chez le rat porteur de la tumeur de Walker.  
Bull. Ass. Franç. Cancer, 1960, 47, 427-433.
- 79 - LOUIS (C.J.)  
Investigation of tumours of the skin (epidermis) using a histochemical technique.  
Surg. Gynec. Obst., 1958, 107, 317-326.
- 80 - LUMSDEN (T.)  
The growth of mammalian tissue in pure serum.  
Lancet, 1924, 2, 65.

- 81 - LUMSDEN (T.)  
Immunity to implanted malignant tumours.  
*Lancet*, 1927, 1, 116-122.
- 82 - MALMGREEN (R.A.)  
Influence of antigenic factors in the production of antitumor cytotoxic sera.  
*J. Nat. Cancer Inst.*, 1959, 20, 417-429.
- 83 - MELLORS (R.C.)  
Fluorescent antibody method.  
In *Analytical cytology* edited by Mellors, 1962, p. 1-67.
- 84 - MICHAELIS (L.), LEWIN (C.)  
Ueber ein Transplantables Ratten carcinoma.  
*Berl. Klin. Wchnschr.*, 1907, 44, 419-421.
- 85 - MOREAU (H.)  
Recherches expérimentales sur la transmissibilité de certains néoplasmes.  
*Arch. Med. Exp.*, 1894, 6, 677-705.
- 86 - NAIRN (R.C.), RICHMOND (H.G.), FOTHERGILL (J.E.)  
Differences in staining of normal and malignant cells by non-immune fluorescent protein conjugates.  
*Brit. Med. J.*, 1960, 5209, 1341-1343.
- 87 - NAIRN (R.C.), FOTHERGILL (J.E.), Mac ENTEGART (M.G.), RICHMOND (H.G.)  
Loss of gastro intestinal specific antigen in neoplasm.  
*Brit. Med. J.*, 1962, 5295, 1791-1793.
- 88 - NAIRN (R.C.), FOTHERGILL (J.E.), Mac ENTEGART (M.G.), PORTEOUS (I.B.)  
Gastro-intestinal-specific antigen : an immuno-histological and serological study.  
*Brit. Med. J.*, 1962, 5295, 1788-1790.
- 89 - NAIRN (R.C.)  
Fluorescent Protein Tracing.  
Livingstone, Edinburgh, 1962, 280 p.
- 90 - NAIRN (R.C.), RICHMOND (G.J.), Mac ENTEGART (M.G.), FOTHERGILL (J.E.)  
Immunological differences between normal and malignant cells.  
*Brit. Med. J.*, 1960, 5209, 1335-1340.

- 91 - NAIRN (R.C.), PHILIP (J.), GHOSE (T.), PORTEOUS (I.B.), FOTHERGILL (J.E.)  
Production of a precipitin against renal cancer.  
Brit. Med. J., 1963, 5347, 1702-1704.
- 92 - NETTLESHIP (A.)  
Regression produced in the murphy lymphosarcoma by the injection of heterologous antibodies.  
Am. J. Path., 1945, 21, 527-541.
- 93 - NOYES (W.F.), MELLORS (R.C.)  
Fluorescent antibodies detection of the antigens of papilloma virus in papillomas of the wild and domestic rabbit.  
J. Exp. Med., 1957, 106, 555-562.
- 94 - OUCHTERLONY (O.)  
In vitro method for testing toxin-producing capacity of diptheria bacteria.  
Acta Path. Microbiol. Scand., 1948, 25, 186-191.
- 95 - OUDIN (J.)  
L'analyse immunochimique qualitative : methode par diffusion des antigenes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé.  
Ann. Inst. Pasteur, 1948, 75, 30-51.
- 96 - PALADE (G.E.), SIEKEVITZ (P.)  
Liver microsomes ; an integrated morphological and biochemical study.  
J. Biophys. Cytol., 1956, 2, 171-200.
- 97 - PARIGOT (J.), LACOUR (F.), LACOUR (J.)  
Présence, dans le sérum des cancéreux, d'anticorps à leur propre tumeur.  
Bull. Ass. Franç. Et. Cancer, 1958, 45, 454-459.
- 98 - PERLMANN (P.), D'AMELIO (V.)  
Soluble antigens in microsomes and other cell fractions of rat liver.  
Nature, 1958, 181, 491-492.
- 99 - PREHN (R.T.)  
Tumor specific immunity to transplanted dibenz [a, h.] anthracene induced sarcomas.  
Cancer Research, 1960, 20, 1614-1617.
- 100 - PREHN (R.T.), MAIN (J.M.)  
Immunity to methyl cholantrene induced sarcomas.  
J. Nat. Cancer Inst , 1957, 18, 769-778.

- 100 - ROY (R.)  
(bis) Intérêt de la leucoconcentration dans un cas de cancer du rein.  
Thèse Med. Nancy, 1961.
- 101 - PRESSMAN (D.), EISEN (H.N.)  
Specific localization of anti-rat-lung serum in the lung.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 73, 143-146.
- 102 - PRESSMAN (D.), SHERMAN (B.)  
The zone of localization of antibodies. XI. The in vivo purification of kidney localizing antikidney antibody.  
J. Immunol., 1951, 67, 15-20.
- 103 - PRESSMAN (D.), SHERMAN (B.), KORNGOLD (L.)  
The zone of localization of antibodies. XIII. The in vivo localization of anti-liver-blood-vessel antibodies in the rat.  
J. Immunol., 1951, 67, 493-500.
- 104 - PRESSMAN (D.), SHERMAN (B.), KORNGOLD (L.)  
Localizing properties of anti-rat-aorta antibodies.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 80, 427-429.
- 105 - PRESSMAN (D.), YAGI (V.), HIRAMOTO (R.)  
A comparison of fluorescein and I<sub>131</sub> as labels for determining the in vivo localization of anti-tissue antibodies.  
Int. Arch. Allergy, 1958, 12, 125-136.
- 106 - REVESZ (L.)  
Detection of antigenic differences in isologous host tumor systems by pre-treatment with heavily irradiated tumor cells.  
Cancer Research, 1960, 20, 443-451.
- 107 - RICHET (C.), HERICOURT (J.)  
Le sérum anticancéreux obtenu par immunisation. A propos de la note de Monsieur WLAEFF.  
C. R. Soc. Biol., 1900, 1051-1052.
- 108 - SALMON (P.)  
Immunité dans le cancer expérimental.  
C. R. Soc. Biol., 1926, 95, 35.
- 109 - SIMON (C.E.), THOMAS (W.S.)  
On complement-fixation in malignant diseases.  
J. Exp. Med., 1908, 10, 673-689.

- 110 - SNELL (G.D.), CLOUDMAN (A.M.), FAILOR (E.A.), DOUGLASS (P.)  
Inhibition and stimulation of tumor homoiotransplants by prior injections of lyophilised tumor tissue.  
J. Nat. Cancer Inst., 1946, 6, 303-316.
- 111 - STICKER (A.)  
Transplantables lymphosarkom des Hundes ; ein Beitrag zur Lehre der Krebsübertragbarkeit.  
Ztschr. f. Krebsforsch., 1903, 1904, 1, 413-444.
- 112 - TALMAGE (T.W.), DIXON (F.J.), BUKANTZ (S.C.), DAMMIN (G.J.)  
Antigen elimination from blood as early manifestation of immune response.  
J. Immunol., 1951, 67, 243-255.
- 113 - TYZZER (E.E.)  
A study of inheritance in mice with reference to their susceptibility to transplantable tumours.  
J. Med. Res., 1909, 21, 519-573.
- 114 - VENDRELY (C.), RIVIERE (M.R.), GUERIN (M.)  
Etude cytophotométrique de l'évolution des métastases de la tumeur T 8.  
Bull. Ass. Franç. Et. Cancer, 1962, 49, 35-43.
- 115 - VIDAL (E.)  
Recherches sur les sensibilisatrices contenues dans le sang des animaux traités par des émulsions de cancers épithéliaux.  
Bull. Ass. Franç. Et. Cancer, 1910, 3, 81-92.
- 116 - VOISIN (C.A.)  
Greffes tumorales et facilitation immunologique "immunological enhancement".  
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1963, 8, 927-942.
- 117 - WATERMAN (N.)  
Cancer et immunologie. IV. L'antigène cancéreux.  
Bull. Ass. Franç. Et. Cancer, 1957, 44, 115-133.
- 118 - WEILER (E.)  
Loss of specific cell antigen in relation to carcinogenesis.  
Ciba Foundation, 1959, 165-175.

- 119 - WEILER (E.)  
Die Änderung der serologischen Spezifität von Leberzellen der Ratte während der Cancerogenese durch p-dimethyl-aminoazobenzol.  
Ztschr. Naturforsch., 1956, 11b, 31-38.
- 120 - WEILER (E.)  
Die Änderung der serologischen organspezifität beim Buttergelb-tumor der Ratte in Vergleich zu normaler Leber.  
Ztschr. Naturforsch., 1952, 7b, 324-326.
- 121 - WEILER (E.)  
Antigenic differences between normal hamster kidney and stilboestrol induced kidney carcinoma : complement fixation reaction with cytoplasmic particles.  
Brit. J. Cancer, 1956, 10, 553-559.
- 122 - WEILER (E.)  
Antigenic differences between normal hamster kidney and stilboestrol induced kidney carcinoma : histological demonstration by means of fluorescing antibodies.  
Brit. J. Cancer, 1959, 10, 560-563.
- 123 - WEILER (E.)  
A cellular change in Hamster kidney cultures : loss of tissue specific antigens.  
Exp. Cell. Research, 1959, suppl. 7, 244-262.
- 124 - WISSLER (R.W.), BARKER (P.A.), FLAX (M.H.), LA VIA (M.F.), TALMAGE (D.W.)  
A study of the preparation localization and effects of antitumor antibodies labeled with I<sub>131</sub>.  
Cancer Research, 1956, 16, 761-773.
- 125 - WLAEFF (G.)  
Serum anticellulaire.  
C.R. Soc. Biol., 1900, 52, 611-613.
- 126 - WLAEFF (G.)  
Traitement des tumeurs malignes par le sérum anticellulaire.  
Bull. Mem. Soc. Chir. Paris, 1901, 27, 132-151.
- 127 - WOGLOM (W.H.)  
Immunity to transplantable tumours.  
Cancer Rev., 1929, 4, 129-214.

128 - ZILBER (L.A.)

Studies on tumor antigens.

J. Nat. Cancer Inst., 1957, 18, 341-358.



## TABLE DES MATIERES

|                                                                                  | Pages |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| INTRODUCTION                                                                     | 1     |
| HISTORIQUE                                                                       | 4     |
| I - Enrichissement des connaissances et des techniques<br>en biologie cellulaire | 4     |
| II - Les techniques de recherche                                                 | 6     |
| RAPPEL IMMUNOLOGIQUE                                                             | 12    |
| PRINCIPE ET REALISATION DE L'EXPERIMENTATION                                     | 15    |
| I - Entretien de la souche                                                       | 15    |
| II - Préparation des homogénats de tumeur                                        | 16    |
| III - Isolement des microsomes, Préparation des antigènes                        | 17    |
| IV - Immunisation des lapins, Recueil des sérums, Marqua-<br>ge                  | 18    |
| V - Utilisation de l'immunsérum                                                  | 19    |
| RESULTATS                                                                        | 21    |
| I - Histologie de la tumeur                                                      | 22    |
| II - Immunofluorescence                                                          | 25    |
| III - Double diffusion en gélose                                                 | 32    |

|                                                                                                          |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>DISCUSSION</b>                                                                                        | 35     |
| I - Nature immunologique de la réaction                                                                  | 35     |
| II - Spécificité de la réaction                                                                          | 36     |
| III - Nature de l'antigène                                                                               | 37     |
| <br><b>CONCLUSION</b>                                                                                    | <br>40 |
| <br><b>TECHNIQUES</b>                                                                                    | <br>42 |
| I - Préparation des antigènes                                                                            | 42     |
| II - Immunisation                                                                                        | 44     |
| III - Conjugaison des sérums avec les fluorochromes                                                      | 44     |
| IV - Utilisation des immunosérums fluorescents                                                           | 45     |
| V - Produits utilisés                                                                                    | 46     |
| VI - Préparation des poudres tissulaires pour absorption<br>des préparations d'immunosérums fluorescents | 46     |
| VII - Lyophilisat                                                                                        | 47     |
| VIII - Conservation des antisérums absorbés par poudre de<br>tissu                                       | 47     |
| IX - Technique de la double diffusion en gélose selon<br>OUCHTERLONY                                     | 47     |
| <br><b>BIBLIOGRAPHIE</b>                                                                                 | <br>49 |

Vu

Nancy, le 3 juin 1964

Le Président de Thèse :

Professeur R. HERBEUVAL

Vu et approuvé

Nancy, le 3 juin 1964

Le Doyen :

Professeur A. BEAU

Vu et Permis d'imprimer

Nancy, le 5 juin 1964

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

P. IMBS

Cet exemplaire est imprimé  
à des fins particulières et ne  
peut en aucun cas être vendu.

Achévé d'imprimer le 29 Juin 1966  
à l'atelier de Documentation Universitaire  
3, Rue Sellier, 3 NANCY

Dépot légal N° 203 Faculté de Médecine Editeur  
2ème trimestre 1966







